

GRACIELE VICCINI

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPOROS DO FUNGO *Clonostachys rosea*
– UM BIOPESTICIDA PARA A CULTURA DO MORANGUEIRO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências: Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências - Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. David Alexander
Mitchell

CURITIBA

2004

Dedico esta tese à minha querida noninha
Regina (*in memorian*). Jamais esquecerei
sua força e bondade, seu lindos e longos
cabelos brancos, perfeitamente presos em
um coque e seu cheirinho de vovó!

AGRADECIMENTOS

É muito bom passar por uma jornada destas e ter tanto a agradecer, e querer a tantos homenagear ... É muito bom dizer obrigada a tantas pessoas que, neste período de mestrado, em que se é acometido de tantos surtos de tristeza, incapacidade, euforia, incerteza, cansaço, alegrias, ..., conseguiram se manter simplesmente presentes, do nosso lado. Por isso, meus sinceros agradecimentos...

... ao bom Deus, pela Graça de estar simplesmente viva, pela permissão de realizar um grande sonho e pela presença constante em todos os momentos da minha vida.

... aos meus pais, Moacyr e Adélia, pelo imenso amor, constante estímulo, enorme compreensão, confortável força, infinita sabedoria e paciência, eterno exemplo.

... aos meus irmãos, Altair e Carla, à minha cunhada, Luana, e as minhas lindas sobrinhas, Talita e Liriel, por serem sempre fontes de estímulo e porto seguro, onde muitas vezes recarreguei minhas forças.

... ao meu orientador, Prof. Dr. David Alexander Mitchell, por ser um interlocutor paciente e generoso, disposto a oferecer estímulos e, principalmente, a percorrer novos caminhos, ouvir com interesse e ânimo todas as questões, dúvidas e problemas que surgiram durante o processo de reflexão. Por sua amizade, principalmente. Pelas conversas e conselhos, não só durante o mestrado, mas desde a época de iniciação científica. Pela compreensão silenciosa dos momentos difíceis e de dúvidas pelos quais passei, permitindo que meu tempo interno fluísse, respeitosamente. Pela alegria de trabalharmos juntos.

... à pesquisadora Rosa Valdebenito-Sanhueza (EMBRAPA/CNPV), por ter cedido a cepa de *Clonostachis rosea*, pois sem esse “lindo e meigo funguinho cor-de-rosa” nada seria possível.

... à pesquisadora Deise Capalbo (EMBRAPA/CNPMA), por ter me recebido tão bem em Campinas e ter me ensinado os “primeiros passos” no trabalho com o fungo *Clonostachys rosea*, além de sempre estar disposta a esclarecer minhas dúvidas.

... ao colega de laboratório e amigo Rodrigo Faria, por ter me ensinado todos os procedimentos de laboratório, pelas conversas, repreensões carinhosas, conselhos, amizade e apostas perdidas.

... as minhas especiais e queridíssimas amigas, Fernanda, Rafaella, Giovana e Angela, pela amizade, paciência, conselhos, reclamações, enfim, por tudo que a amizade mais sincera e verdadeira encerra.

... aos amigos que trabalham no Laboratório de Fermentações, em especial: Wellington, Vivian, Marcelo Barga e Ricardo Susuki, que muitas vezes me ajudaram a realizar os experimentos.

... ao Michael, por desempenhar tão bem sua função “dupla”: meu estagiário que me ajudou nos experimentos, mesmo em fins de semana e feriados; e um super amigo e colega de classe do CEFET. Obrigada por amenizar os momentos difíceis, por agüentar meu mau humor e reclamações, pelas caronas, pelo X-Pastel, pelas brincadeirinhas, enfim, por tudo, pois como você sempre disse: “eu não teria feito sem sua ajuda”.

... ao Phelipe, “adendo do nosso laboratório”, pela amizade, companhia e pela grande ajuda na etapa “pigmento”.

... ao Professor Guilherme L. Sasaki, pelas idéias, pelo incentivo, pelas análises de RMN e de CG-EM e por suas correções.

... ao Professor Leonardo, pelo auxílio e liberdade durante o estágio de docência e pelo empréstimo da Máquina Fotográfica.

... aos colegas do Mestrado, estes, ah, estes de maneiras tão especiais! À Giovana, constante amiga desde o nivelamento, pela confiança e, claro, por todos os churrascos. À Gerusa, por acreditar em mim e se tornar uma amiga tão querida, pelos conselhos, pela companhia e por seu incrível caráter. À Ana Helena, pela amizade e pelas conversas, ou melhor, compartilhamento de alegrias, sonhos, frustrações e dúvidas, pelo seu silencioso bem querer, sempre pronta a ouvir. Ao Lauro, pelas conversas e por sua insistência sem fim... Aos demais colegas: Tatiana, Patrícia, Juliana, Marcelo, Diogo, Gustavo e Marcelinho, que compartilharam as primeiras trilhas deste caminho e pelos momentos alegres que passamos juntos.

... aos demais colegas de departamento, pelas conversas durante o almoço na salinha ou nos corredores e por todos os empréstimos, em especial Ana Paula, André Luís, Eduardo (Baiano), Luís Eduardo e Ricardo, pessoas maravilhosas que conheci durante este período.

... à Professora Fanny, por ter acreditado em minha capacidade e ter confiado no meu discernimento.

... à Elaine, pela ajuda na fase final de formatação da tese, sempre contrariando as minhas normas da ABNT.

... aos amigos “externos” Tiago, Caxias, Jago, Diogo, Rodrigo, Brenda, Maricelma, Gustavo, Anne, Rose, Juliana, Sérgio, tantos, e por tantas diferentes formas, que nem sei como dizer obrigada a vocês, mas é preciso, porque também com vocês quero compartilhar esta vitória.

... ao Valdecir (*in memoriam*), pois sei que aonde estiver estará feliz por mim.

... aos professores do curso de Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular, dedicados à arte de ensinar, pela contribuição para o meu progresso acadêmico.

... à secretária do Departamento, Nancy, e a secretária da Pós-Graduação, Marilza, pela ajuda prestada ao longo desta jornada.

... ao CNPq, pela concessão da bolsa.

... à todos que, direta ou indiretamente contribuíram, agradeço, profundamente, e dedico o resultado deste trabalho.

Graciele Viccini

Curitiba, dezembro de 2004.

O desejo de conquistar é algo de extraordinário e natural, e aqueles que se entregam a tal desejo quando possuem os meios para realizá-lo são antes louvados que censurados.

Nicolau Maquiavel
(3/5/1469-1527)
Filósofo e político italiano.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xiii
RESUMO.....	xv
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 CONTROLE BIOLÓGICO – ALTERNATIVA PARA A PRODUÇÃO ORGÂNICA.....	1
1.2 <i>Botrytis cinerea</i> EM MORANGUEIRO - A NECESSIDADE DE BIOCONTROLE.....	2
2..REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 CONTROLE BIOLÓGICO.....	5
2.2 AGENTE DE BIOCONTROLE <i>Clonostachys rosea</i>	8
2.2.1 Morfologia e Taxonomia.....	8
2.2.2 Ecologia.....	9
2.3 MOFO CINZENTO – <i>Botrytis cinerea</i> Pers. & F.....	9
2.4 <i>Clonostachys rosea</i> : UM POTENTE ANTAGONISTA PARA <i>Botrytis</i> <i>cinerea</i>	13
2.5 TÉCNICAS UTILIZADAS PARA A PRODUÇÃO DE <i>C. rosea</i>	19
2.6 AVALIAÇÃO DO ESTADO DA LITERATURA.....	22
3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	23
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
4.1 ESQUEMA GERAL DE DISTRIBUIÇÃO DOS EXPERIMENTOS.....	26
4.2 MANUTENÇÃO DA CULTURA.....	27
4.3 PREPARO DE PLACAS DE PETRI PARA AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO MICELIAL.....	27
4.4 TEMPO DE INCUBAÇÃO DAS PLACAS DE PETRI PARA PRODUÇÃO DE ESPOROS PARA INÓCULO.....	28
4.5 PREPARO DO INÓCULO.....	29
4.6 TEMPO DE AGITAÇÃO PARA LIBERAÇÃO DOS ESPOROS DOS GRÃOS DE SUBSTRATO.....	29
4.7 FORMA DE OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS EM ERLLENMEYERS.....	30
4.8 CARACTERIZAÇÃO DA CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE ESPOROS DE <i>C. rosea</i> SOBRE GRÃOS DE TRIGO.....	31
4.9 PREPARO DO MEIO DE CULTURA - METODOLOGIA GERAL.....	31
4.10 PRODUÇÃO DE ESPOROS EM DIFERENTES TEORES INICIAIS DE ÁGUA.....	32
4.11 PRODUÇÃO DE ESPOROS EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE AERAÇÃO.....	33
4.12 PRODUÇÃO DE ESPOROS EM DIFERENTES REGIMES DE AGITAÇÃO.....	35
4.13 PRODUÇÃO DE ESPOROS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE INÓCULO.....	35
4.14 PRODUÇÃO DE ESPOROS EM SACOS PLÁSTICOS.....	36

4.15 AMOSTRAGEM.....	37
4.15.1 Amostragem para Determinação de Peso Seco.....	37
4.15.2 Amostragem para Avaliação da Cinética de Produção de Esporos – Substrato: Grãos.....	38
4.15.3 Amostragem para Avaliação da Cinética de Produção de Esporos – Substrato: BDA.....	38
4.16 CONTAGEM DE ESPOROS – CÂMARA DE NEUBAUER.....	38
4.17 PRODUÇÃO DO PIGMENTO EM FERMENTAÇÃO LÍQUIDA.....	39
4.17.1 Preparo do Inóculo de <i>C. rosea</i>	39
4.17.2 Preparo do Meio Líquido de Batata Dextrose.....	39
4.18 EXTRAÇÃO DO PIGMENTO.....	39
4.19 PURIFICAÇÃO DO PIGMENTO.....	40
4.20 IDENTIFICAÇÃO DO PIGMENTO.....	41
4.20.1 Análise por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13 (RMN- ¹³ C).....	41
4.20.2 Análise por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (CG-EM).....	42
4.21 FOTOGRAFIAS.....	42
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
5.1 ESTUDOS PRELIMINARES DE CULTIVO DE <i>Clonostachys rosea</i> PARA DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO MICELIAL.....	43
5.2 PROTOCOLO PARA AVALIAÇÃO DOS EXPERIMENTOS DE PRODUÇÃO DE ESPOROS.....	49
5.2.1 Produção de Esporos em Placas de Petri para Inóculo.....	50
5.2.2 Cinética de Liberação de Esporos de Substratos Sólidos.....	51
5.2.3 Influência das Formas de Obtenção da Amostra na Produção de <i>C. rosea</i> sobre Grãos de Arroz em Erlenmeyers.....	53
5.3 CARACTERIZAÇÃO DA CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE ESPOROS DE <i>C. rosea</i> SOBRE GRÃOS DE TRIGO.....	56
5.4 SELEÇÃO DE UM SUBSTRATO PARA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE <i>C. rosea</i> EM ERLLENMEYERS.....	61
5.4.1 Produção de Esporos de <i>C. rosea</i> Utilizando Diferentes Formas de Preparo do Substrato – Grãos de Trigo.....	61
5.4.2 Produção de esporos de <i>C. rosea</i> em diferentes substratos.....	64
5.5 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO NO SUBSTRATO SELECIONADO.....	70
5.5.1 Produção de Esporos de <i>C. rosea</i> sobre Grãos de Arroz em Erlenmeyers em Diferentes Teores Iniciais de Água.....	70
5.5.2 Produção de Esporos de <i>C. rosea</i> sobre Grãos de Arroz com Diferentes Métodos de Fechamento dos Erlenmeyers.....	74
5.5.3 Produção de Esporos de <i>C. rosea</i> sobre Grãos de Arroz em Erlenmeyers em Diferentes Concentrações Iniciais de Inóculo.....	77
5.5.4 Produção de Esporos de <i>C. rosea</i> sobre Grãos de Arroz em Erlenmeyers em Diferentes Regimes de Agitação.....	83

5.6	TESTE DE CULTIVO EM SACOS.....	86
5.7	ANÁLISE DOS PIGMENTOS.....	89
5.7.1	Análise Estrutural Fina por RMN de ^{13}C e RMN de ^{13}C DEPT do Pigmento.....	89
5.7.2	Análise de AGME do Triacilglicerídeo da Amostra Cr12/0 por CG-EM.....	91
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	94
	REFERÊNCIAS.....	97
	APÊNDICE 1 – CÂMARA DE NEUBAUER.....	103
	APÊNDICE 2 – DADOS PARA AS FIGURAS.....	109

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	ESQUEMA SIMPLIFICADO DE UM PROGRAMA DE PESQUISA PARA DESENVOLVER UM AGENTE DE CONTROLE BIOLÓGICO.....	7
FIGURA 2 -	CONÍDIOS E CONIDIÓFOROS VERTICILADO E PENICILADO DE <i>C. rosea</i>	8
FIGURA 3 -	<i>Botrytis cinerea</i>	10
FIGURA 4 -	MOFO CINZENTO CAUSADO POR <i>Botrytis cinerea</i> EM MORANGO.....	11
FIGURA 5 -	FLUXOGRAMA GERAL DA ESTRATÉGIA DE TRABALHO.....	26
FIGURA 6 -	ESQUEMA EXPERIMENTAL PARA AVALIAR E ELUCIDAR A CINÉTICA BÁSICA DE CRESCIMENTO DO FUNGO <i>C. rosea</i>	27
FIGURA 7 -	PLANÍMETRO.....	28
FIGURA 8 -	DIFERENTES LOCAIS DE OBTENÇÃO DA AMOSTRA.....	30
FIGURA 9 -	ESQUEMA DO EXPERIMENTO DE PRODUÇÃO DE ESPOROS EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE AERAÇÃO....	34
FIGURA 10 -	DESENVOLVIMENTO DE <i>C. rosea</i> EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE TEMPERATURA E FOTOPERÍODO (10 DIAS APÓS INOCULAÇÃO).....	44
FIGURA 11 -	CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE <i>C. rosea</i> EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE TEMPERATURA E FOTOPERÍODO.....	45
FIGURA 12 -	CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE ESPOROS EM PLACAS DE PETRI.....	50
FIGURA 13 -	CINÉTICA DE LIBERAÇÃO DE ESPOROS UTILIZANDO ARROZ COMO SUBSTRATO.....	53
FIGURA 14 -	INFLUÊNCIA DE DIFERENTES LOCAIS DE RETIRADA DE AMOSTRA NA PRODUÇÃO DE ESPOROS SOBRE ARROZ	55
FIGURA 15 -	PERFIL DE PRODUÇÃO DE ESPOROS DE <i>C. rosea</i> SOBRE TRIGO, MOSTRANDO O AJUSTE DA EQUAÇÃO LOGÍSTICA (- - -) E DO MODELO DE DESACELERAÇÃO (—) AOS DADOS (Δ).....	58
FIGURA 16 -	PERFIL DE PRODUÇÃO DE ESPOROS DE <i>C. rosea</i> SOBRE TRIGO, COM AJUSTE DA EQUAÇÃO LOGÍSTICA (- - -) – DADOS DE DALL’ONDER (1997).....	60
FIGURA 17 -	PRODUÇÃO DE ESPOROS UTILIZANDO DIFERENTES FORMAS DE PREPARAÇÃO DO SUBSTRATO – GRÃOS DE TRIGO.....	63
FIGURA 18 -	PRODUÇÃO DE ESPOROS UTILIZANDO ARROZ E TRIGO COMO SUBSTRATO.....	66

FIGURA 19 - PERFIL DE PRODUÇÃO DE ESPOROS DE <i>C. rosea</i> SOBRE TRIGO (O) E ARROZ BRANCO (©), COM AJUSTE DA EQUAÇÃO LOGÍSTICA (—) AOS DADOS.....	67
FIGURA 20 - PRODUÇÃO DE ESPOROS UTILIZANDO DOIS TIPOS DISTINTOS DE ARROZ COMO SUBSTRATO.....	68
FIGURA 21 - PERFIL DE PRODUÇÃO DE ESPOROS DE <i>C. rosea</i> SOBRE ARROZ BRANCO (©) E ARROZ INTEGRAL (Δ), COM AJUSTE DA EQUAÇÃO LOGÍSTICA (—) AOS DADOS.....	69
FIGURA 22 - PRODUÇÃO DE ESPOROS EM DIFERENTES TEORES INICIAIS DE ÁGUA.....	71
FIGURA 23 - PROCESSOS DE TRANSFERÊNCIA DE OXIGÊNIO NOS ESPAÇOS ENTRE AS PARTÍCULAS DE SUBSTRATO (1) E ENTRE A FASE INTER-PARTÍCULAS E A PARTÍCULA EM SI (2).....	72
FIGURA 24 - VARIAÇÃO DA FRAÇÃO DE ÁGUA EM TRATAMENTOS COM DIFERENTES TEORES INICIAIS DE ÁGUA.....	73
FIGURA 25 - PRODUÇÃO DE ESPOROS (A) E VARIAÇÃO DA FRAÇÃO DE ÁGUA (B) EM TRÊS CONDIÇÕES DE AERAÇÃO DIFERENTES.....	76
FIGURA 26 - PRODUÇÃO DE ESPOROS UTILIZANDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE INÓCULO.....	80
FIGURA 27 - COMPARAÇÃO ENTRE A PRODUÇÃO MÁXIMA DE ESPOROS OBTIDA E AS CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE INÓCULO UTILIZADAS.....	80
FIGURA 28 - VARIAÇÃO DA FRAÇÃO DE ÁGUA EM TRATAMENTOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE INÓCULO.....	82
FIGURA 29 - PRODUÇÃO DE ESPOROS EM DIFERENTES REGIMES DE AGITAÇÃO.....	84
FIGURA 30 - COMPARAÇÃO ENTRE A PRODUÇÃO MÁXIMA DE ESPOROS OBTIDA E OS DIFERENTES REGIMES DE AGITAÇÃO.....	85
FIGURA 31 - ASPECTOS DO MEIO DE CULTIVO NOS DIFERENTES REGIMES DE AGITAÇÃO.....	86
FIGURA 32 - EXPERIMENTO EM ESCALA PILOTO PARA PRODUÇÃO DE ESPOROS DO FUNGO <i>C. rosea</i> EM SACOS PLÁSTICOS.....	87
FIGURA 33 - PRODUÇÃO DE ESPOROS DO FUNGO <i>C. rosea</i> EM SACOS PLÁSTICOS.....	88
FIGURA 34 - ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C DA AMOSTRA Cr12/0.....	90
FIGURA 35 - ESPECTRO DE RMN 1D ¹³ C-DEPT DA AMOSTRA Cr12/0...	91
FIGURA 36 - CÂMARA DE NEUBAUER.....	105

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	EXEMPLOS DE APLICAÇÃO DE <i>C. rosea</i>	16
TABELA 2 -	PRODUÇÃO DO AGENTE DE BIOCONTROLE <i>C. rosea</i> EM DIFERENTES CONDIÇÕES.....	20
TABELA 3 -	CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS UTILIZADAS.....	33
TABELA 4 -	OBSERVAÇÃO DO INÍCIO DA ESPORULAÇÃO NAS COLÔNIAS INCUBADAS EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE TEMPERATURA E LUMINOSIDADE.....	49
TABELA 5 -	FORMAS DIFERENCIAL E INTEGRAL DE EQUAÇÕES EMPÍRICAS DE CRESCIMENTO.....	57
TABELA 6 -	ANÁLISE CINÉTICA DO PERFIL DE PRODUÇÃO DE ESPOROS DE <i>C. rosea</i> UTILIZANDO QUATRO MODELOS EMPÍRICOS.....	59
TABELA 7 -	COMPOSIÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS PRESENTES NO TRIACILGLICERÍDEO NEUTRO PURIFICADO.....	92
TABELA 8 -	PROTOCOLO PARA OBTENÇÃO DE 10 %, 15 % E 20 % DE ACURÁCIA.....	106
TABELA 9 -	EXEMPLO DE CONTAGEM DE ESPOROS.....	108

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
pH	Potencial Hidrogeniônico
FES	Fermentação em Estado Sólido
FL	Fermentação Líquida
Fig.	Figura
Tab.	Tabela
h	Horas
MA	Ministério da Agricultura
mL	Mililitro
>	Maior que
<	Menor que
cfu	Colony forming unit – unidades formadoras de colônia
RMN- ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
RMN de ¹³ C DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
CG-EM	Cromatografia Gasosa e Espectrometria de Massa
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
BDA	Batata dextrose ágar
PVC	Policloreto de vinila
min	Minuto
v/v	Volume por volume
rpm	Rotações por minuto
ppm	Partes por milhão
Cr0	<i>Clonostachys rosea</i> incubado em 0 h de luz
Cr12	<i>Clonostachys rosea</i> incubado em 12 h de luz
Cr24	<i>Clonostachys rosea</i> incubado em 24 h de luz
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
UV	Radiação ultra-violeta
CDCl ₃	Clorofórmio Deuterado
TMS	Tetrametilsilano
AGME	Ácidos graxos metil ésteres
IE-EM	Impacto de elétrons – Espectrometria de massa
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
MeOH	Metanol
d.i.	Diâmetro interno
R _t	Tempo de retenção
K	taxa de produção de esporos linear (número de esporos (g ⁻¹ substrato .dia))
k	coeficiente de decaimento de 1ª ordem do modelo de desaceleração (dia ⁻¹)
L	fração de pontas de hifas que sobrevive a entrada no modelo de desaceleração (adimensional)
t	tempo (dia)

t_a	tempo inicial do modelo de desaceleração (dia)
N	concentração de esporos (número de esporos g^{-1} substrato)
N_o	concentração de esporos inicial (número de esporos g^{-1} substrato)
N_m	concentração máxima de esporos possível (número de esporos g^{-1} substrato)
N_A	concentração de esporos no tempo inicial do modelo de desaceleração (número de esporos g^{-1} substrato)
μ	parâmetro relacionado com a velocidade de produção de esporos (dia^{-1})
SRQ	Soma dos Resíduos Quadrados
kPa	Quilo Pascal
T	temperatura ($^{\circ}C$)
c/	com
s/	sem
C1, C2, C3, C4 e C5	Concentração de esporos
D	Dia
TD	Todo dia
ND	Nenhum dia
$C_{X:Y}^{\Delta Z}$	Carbono <small>número de carbonos : número de insaturações</small> <small>posição das insaturações</small>

RESUMO

O objetivo principal do trabalho foi otimizar a produção de esporos de *Clonostachys rosea* para uso no controle biológico do fungo *Botrytis cinerea*, causador do mofo cinzento no morangueiro, baseando-se na utilização de grãos através de técnicas de fermentação em estado sólido (FES). Optou-se pela FES pois este processo fornece vantagens como baixo custo, praticidade e fácil execução, sendo a tecnologia ideal para ser transferida diretamente ao produtor rural, que poderá produzir seu biofungicida de uma maneira simples e de baixo custo. Inicialmente foi feita a padronização das condições para a produção de esporos e os protocolos para avaliá-la, onde optou-se por: cultivar o fungo em 24 h luz e 24 °C por ser a condição onde apresentou desenvolvimento e esporulação mais rápidos; preparar inóculo a partir de placas incubadas a 8 dias que apresentaram elevada produção de esporos; fazer a agitação por 30 minutos da amostra em solução de água e Tween para assegurar a liberação máxima de esporos e misturar bem o substrato colonizado antes de retirar a amostra para avaliar a produção. Foi feita também a caracterização da cinética de produção de esporos e a equação logística foi a que melhor descreveu os perfis de produção. Através da avaliação de perfis feitos com diferentes substratos, o arroz branco tipo agulhinha foi selecionado para o cultivo do fungo. A seguir, foram feitos estudos de otimização das condições de cultivo através da seleção de condições ideais, sendo que as mais promissoras, foram: adição de 7,5 mL para cada 10 g de substrato antes da autoclavagem; uso de tampão de algodão e gaze para fechar os erlenmeyers; concentração inicial de inóculo de 2×10^5 esporos g^{-1} substrato seco e agitação manual a cada 15 dias ou sem agitação. Com essas condições foram obtidos rendimentos de $3,36 \times 10^9$ esporos g^{-1} de arroz em 60 dias, valor igual aos melhores relatados na literatura. Além disso, o fungo apresentou variações na coloração em diferentes condições de temperatura e fotoperíodo e o estudo preliminar para caracterizar o pigmento produzido na condição de 12 h de luz e 20 °C, indicou que ele é um triacilglicerídeo composto por 10 diferentes ácidos graxos. É importante dar continuidade a este estudo, tentando elucidar a estrutura destes compostos, para, no futuro, pesquisar sua função e, quem sabe, encontrar alguma aplicação biotecnológica.

1 INTRODUÇÃO

Esta dissertação trata da viabilização e otimização da produção, através da técnica de fermentação em estado sólido, do fungo *Clonostachys rosea* que atua como agente de controle biológico do mofo cinzento (*Botrytis cinerea*), uma doença que atinge muitas culturas, entre elas o morango.

1.1 CONTROLE BIOLÓGICO – ALTERNATIVA PARA A PRODUÇÃO ORGÂNICA

A escolha de um agente de controle biológico para tentar resolver este problema baseia-se dentro de uma visão de produção orgânica que atualmente é considerada uma alternativa tanto para o mercado interno, que deseja um produto mais saudável e sem resíduos químicos, quanto para a obtenção de novos mercados para exportação. O sistema orgânico é praticado em mais de uma centena de países e apresenta rápida expansão devido ao aumento de custos da agricultura convencional, à degradação do meio ambiente e à crescente exigência dos consumidores por produtos livres de substâncias químicas ou geneticamente modificadas.

No Brasil a produção de alimentos orgânicos teve um grande impulso nos últimos anos. Atraídos pelo preço dos produtos no mercado, em média 30% mais elevados do que o produto convencional, por uma possível diminuição nos custos de produção ou por uma maior possibilidade de conservação dos recursos da propriedade rural, o certo é que esse número vem aumentando dia a dia. A demanda cresce cerca de 10% ao ano e, segundo pesquisa do Instituto Gallup, 7 em cada 10 brasileiros consumiriam orgânicos se houvesse mais oferta nos supermercados (VIGLIO, 1996).

O Paraná possui cerca de 3.000 agricultores orgânicos certificados (20% do total de agricultores orgânicos do país) que ocupam uma área de 10.000 hectares composta principalmente por pequenas propriedades. A demanda por produtos orgânicos tem aumentado consideravelmente no Estado, principalmente em Curitiba e região metropolitana. Além disso, a produção orgânica vem apresentando

competitividade com a produção convencional, o que torna o sistema orgânico uma boa opção para o pequeno produtor, que não perde em produtividade, diminui o custo de produção e tem possibilidade de comercializar com prêmios de 30% sobre o produto convencional (DAROLT, 2002).

Contudo, para produzir organicamente um alimento, o produtor tem que abrir mão de muitas “facilidades” que o sistema convencional oferece, dentre elas o uso de agroquímicos (adubos, herbicidas, nematicidas, inseticidas e fungicidas, entre outros) e procurar técnicas alternativas como o controle biológico (FOKKEMA, 1993) onde o controle de pragas e doenças é realizado através do emprego de um organismo (predador, parasita ou patógeno) que ataca outro que esteja causando danos econômicos à cultura, sem o uso de agrotóxicos.

No cultivo convencional do morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) a grande utilização de produtos químicos tem trazido repercussões negativas tanto de caráter técnico quanto de comercialização, visto que este processo favorece a seleção de estirpes de patógenos resistentes, aumenta o risco de permanência de resíduos de defensivos nos frutos, assim como a intoxicação de agricultores e a contaminação do ambiente pela manipulação de fungicidas, o que justifica o interesse do presente trabalho em um biopesticida para essa cultura.

1.2 *Botrytis cinerea* EM MORANGUEIRO – A NECESSIDADE DE BIOCONTROLE

A podridão do fruto causada por *Botrytis cinerea* é uma das mais importantes doenças do morangueiro, reduzindo a produtividade e a qualidade dos frutos e requerendo freqüentes aplicações de fungicidas para manter o controle (BOFF et al., 2003), (BERRIE, 2000), (LEGARD; MERTELY, 2000), (KOVACH; PETZOLDT; HARMAN, 2000). Ela é bastante comum, ocorrendo em todas as regiões do mundo onde se cultiva o morangueiro, e sempre causa grandes prejuízos pois reduz diretamente o produto comercial, podendo chegar a 50% ou mais de perdas (SURGEONER, 1998).

O controle químico tem se tornado muito difícil devido ao desenvolvimento de linhagens resistentes visto que o número de produtos liberados para o controle deste fungo é pequeno (FOKKEMA, 1993), (SALIGKARIAS; GRAVANIS; EPTON, 2002). Além disso, a aplicação constante de fungicidas é muitas vezes dificultada devido ao período de carência (período de tempo entre a aplicação do produto e a colheita/consumo), principalmente porque a produção de frutos pelo morangueiro ocorre ao longo de todo o ciclo (ou, em outras palavras, há frutos em diversos estágios de desenvolvimento durante todo o período) (SURGEONER, 1998). Somando a isso o aumento da preocupação dos consumidores no que diz respeito ao uso de agrotóxicos (SALIGKARIAS; GRAVANIS; EPTON, 2002), (BERRIE, 2000), a resultante implica na necessidade de explorar estratégias alternativas para o controle (BERRIE, 2000).

O fungo filamentosso *Clonostachys rosea* tem emergido como um eficaz e versátil agente de controle biológico contra *Botrytis cinerea* (SUTTON et al., 1997), (SURGEONER, 1998), gerando grande interesse entre produtores e pesquisadores no Canadá, onde foi inicialmente identificado, e em outros países onde também ocorre, entre eles o Brasil (SURGEONER, 1998). Isto deve-se a sua eficácia, confiabilidade, custo de produção e segurança. Além disso, este fungo possui vantagens como: (1) produção de inóculo abundante e viável a longo prazo; (2) esporos aderentes que facilitam manuseio enquanto minimizam qualquer risco de alergia associada com a exposição dos trabalhadores ao produto; (3) seu uso não causa nenhum risco ecológico devido a sua ampla distribuição natural nas plantas e no solo (SURGEONER, 1998). Sendo assim, *C. rosea* é um promissor agente contra o mofo cinzento, podendo, ainda, ser aplicado em diversas culturas, sendo que em cultivos em estufas de begônia, ciclame, gerânio, gérbera, hortênsia, violeta persa (*Exacum*), poinsettia, rosa, pepino, pimentão e tomate, e em morango e framboesa cultivados no campo, sua eficácia contra *B. cinerea* já foi comprovada (SUTTON et al., 1997).

Devido a sua eficácia como agente de biocontrole do fungo *Botrytis cinerea*, extensivamente relatada na literatura, a produção de *Clonostachys rosea* em grande escala é desejada. Contudo, na literatura não há nenhuma informação significativa sobre as condições ideais de cultivo do microrganismo. A maioria dos trabalhos relata

apenas testes de campo realizados para comprovar a eficácia do agente, mas nenhum deles estuda maneiras de melhorar a produção.

Para preencher esta lacuna é necessário elucidar quais as condições de cultivo que permitem obter uma produção maior, mais eficiente e barata. Para isso é necessário definir qual o meio de cultivo mais adequado e as melhores condições de temperatura, umidade, aeração e agitação, entre outros.

Outro ponto importante a ser considerado é a técnica utilizada para a produção do biofungicida, uma vez que a finalidade desta pesquisa é encontrar uma forma de produção alternativa e eficaz que possa ser transferida diretamente aos produtores, permitindo que eles próprios produzam o biofungicida de um modo “artesanal”. Frente a isto, buscou-se selecionar um método relativamente barato, mais prático e de fácil execução, características que se adaptam ao sistema de fermentação em estado sólido (FES), o qual ainda traz como vantagem a produção de esporos mais resistentes que aqueles obtidos em fermentação líquida (FL) (MILJØPROJEKT, 1999).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Esta revisão trata de três pontos principais: primeiro, fornece uma visão geral de controle biológico; depois disso, descreve de forma sucinta o agente de biocontrole *Clonostachys rosea*, o agente causador do mofo cinzento *Botrytis cinerea* e a interação entre eles, caracterizando assim a eficácia de *C. rosea*. Por fim, sumariza e avalia o estado atual das técnicas utilizadas para a produção de *C. rosea*.

2.1 CONTROLE BIOLÓGICO

Dentre os problemas fitossanitários que afetam o morangueiro, as doenças são, sem dúvida, as mais importantes, sendo responsáveis pelo uso da maior parte dos agrotóxicos, o que as torna um dos aspectos mais limitantes para a cultura, que quando não considerado adequadamente, diminui severamente a produtividade e pode aumentar consideravelmente o custo da produção. As doenças do morangueiro são causadas por diversos organismos, como fungos, bactérias e vírus. Dentre estas, as doenças fúngicas são as mais comuns e a convivência racional e seu controle são fatores fundamentais para a exploração da cultura (RONQUE, 1998), implicando na necessidade de buscar métodos alternativos, como o controle biológico.

O controle biológico de uma doença fúngica consiste no emprego de um organismo (predador, parasita ou patógeno) que ataca outro fungo que esteja causando danos econômicos. Existem diferentes estratégias de controle, dentre as quais se destacam: (1) redução do inóculo do fungo através do decréscimo de sua sobrevivência na cultura, decréscimo da produção ou liberação de propágulos viáveis, ou decréscimo da sua expansão pelo crescimento micelial; (2) redução da infecção no hospedeiro causada pelo fungo; e (3) redução da severidade da doença (JAMES; DUMROESE; WENNY, 1992) (FOKKEMA, 1993) (PUNJA; UTKHEDE, 2003).

Pode ser dividido em dois tipos distintos: o controle biológico sem a interferência (ou seja, na forma como é encontrado na natureza), e aquele que é feito mediante introdução, manipulação e aplicação de organismos capazes de agirem de

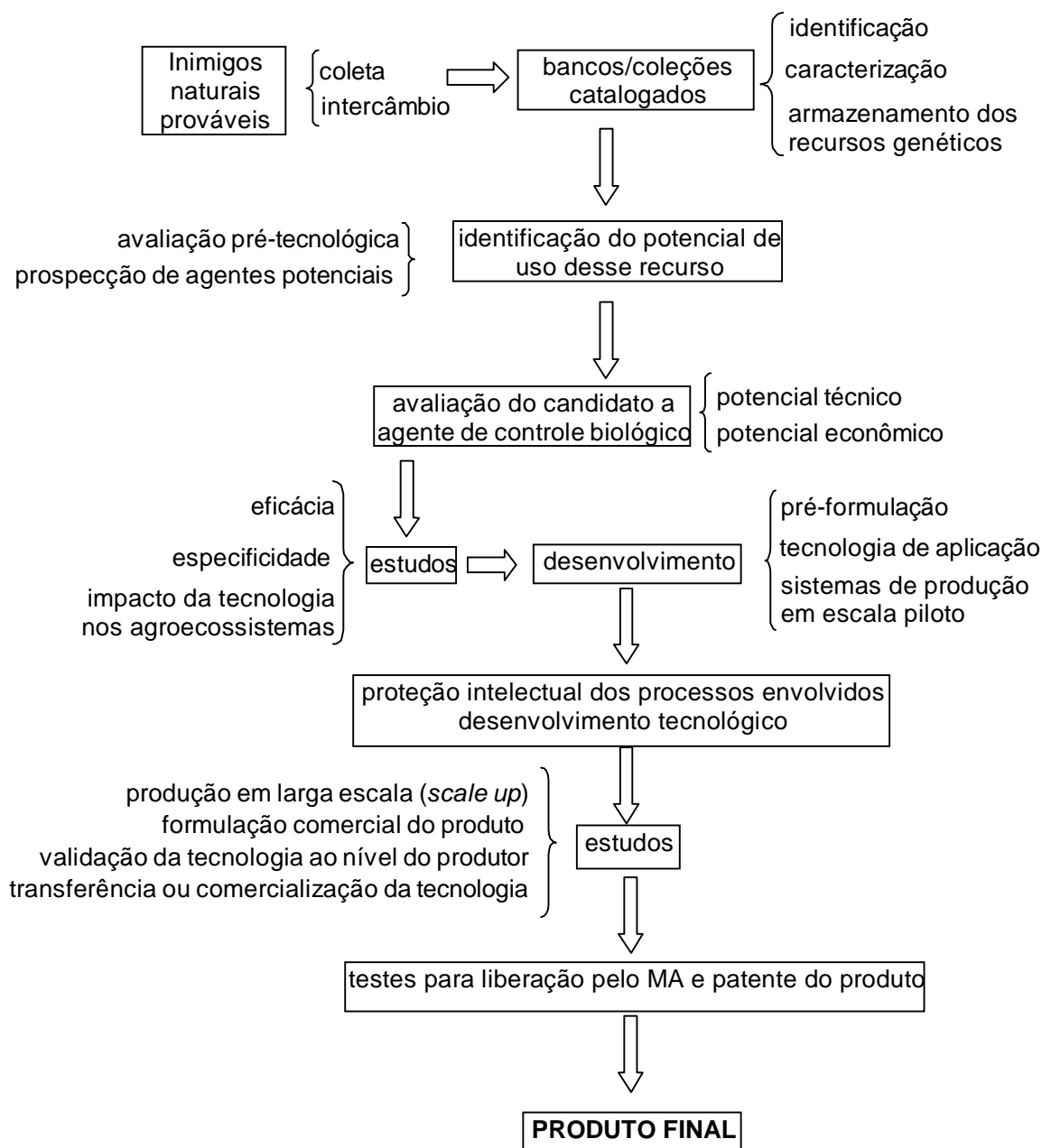
forma contrária as pragas (SILVA, 2003). O controle biológico artificial (podemos assim chamá-lo) ocorre quando o homem interfere de modo a proporcionar um aumento de seres predadores, parasitas ou patógenos, podendo esses serem: insetos (mais atuantes no controle biológico natural), fungos, vírus, bactérias, nematóides e ácaros. Os organismos mais utilizados no controle biológico artificial são fungos, bactérias e vírus, para os quais há inclusive formulações comerciais a venda em lojas de produtos agrícolas (exemplo: Dipel, inseticida biológico feito a partir de *Bacillus thuringiensis*,) (SILVA, 2003).

No entanto, a produção de microrganismos selecionados para uso agropecuário não é uma prática muito difundida no Brasil devido à falta de refino no processo de produção. Sem o refino, o custo de produção aumenta, o que inviabiliza empresas privadas a investir no processo e, por sua vez, o setor agropecuário se priva dos benefícios destes microrganismos.

Entre os pontos cruciais para viabilizar o uso de microrganismos na agropecuária, destacam-se a estabilidade do microrganismo, seu espectro de ação, o substrato destinado à produção, as condições de cultivo, a manutenção da atividade para a qual o microrganismo é destinado durante a fase produtiva, a estocagem do microrganismo e a ausência de riscos tanto ambientais quanto no manuseio do agente microbiano. Assim, um programa de pesquisa para desenvolver um agente de controle biológico envolve diferentes fases, como: obtenção de microrganismos; desenvolvimento da produção em meios de cultivo em base a subprodutos agroindustriais; otimização do processo fermentativo e escalonamento dos processos; recuperação e concentração do produto; formulação e aplicação em campo; registro e comercialização. Estas fases estão representadas de maneira simplificada na Figura 1.

Dentre estas etapas, uma das mais importantes é a de produção do microrganismo, incluindo a seleção do meio, o tipo de processo utilizado para a produção (fermentação em estado sólido, semi-sólido, líquido) e as condições ótimas para o cultivo (temperatura, umidade, atividade de água, pH, aeração e agitação, entre outras).

FIGURA 1 - ESQUEMA SIMPLIFICADO DE UM PROGRAMA DE PESQUISA PARA DESENVOLVER UM AGENTE DE CONTROLE BIOLÓGICO



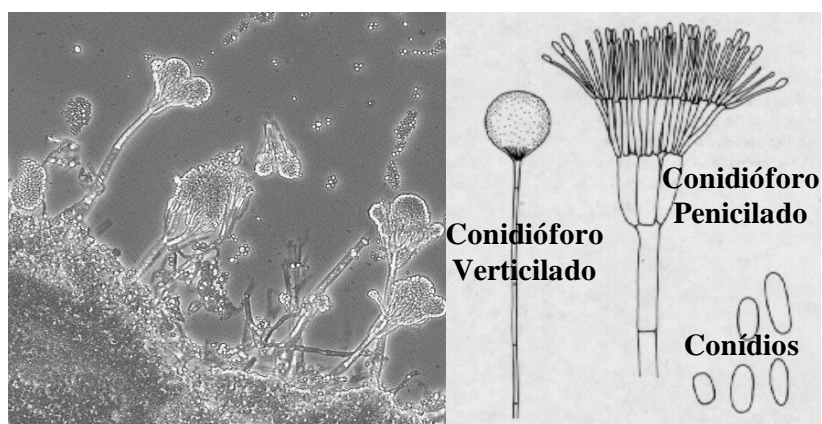
FONTE: O AUTOR

2.2 AGENTE DE BIOCONTROLE *Clonostachys rosea*

2.2.1 Morfologia e Taxonomia

C. rosea é um hifomiceto pouco usual que produz conídios unicelulares em duas formas distintas, penicilado e verticilado (Fig. 2). As colônias do fungo em ágar são geralmente esbranquiçadas, laranjadas ou salmão. *C. rosea* é a forma anamorfa (fase assexuada) de *Nectria ochroleuca* (Schwein.) Berk, um ascomiceto da ordem Hypocreales (SAMUELS citado por SUTTON et al., 1997, p. 316)¹. DOMSCH et al. propôs que ex-*Gliocladium roseum* se tornasse o gênero *Clonostachys* (citado por SUTTON et al., 1997, p. 316)². Hoje é classificado como *Clonostachys rosea* (Link: Fr.) Schroers, Samuels, Siefert, and W. Gams [*Gliocladium roseum* Bainier, teleomorph, *Bionectria ochroleuca* (Schw.) Schroers and Samuels] (SCHROERS et al., 1999). É um micoparasita destrutivo contra alguns fungos que são patógenos vegetais incluindo *Botrytis* spp. (LI et al., 2002).

FIGURA 2 - CONÍDIOS E CONIDIÓFOROS VERTICILADO E PENICILADO DE *C. rosea*



FONTE: (HERRERA, 2000), (MALLOCH, 1997)

¹ SAMUELS, G.H. A revision of the fungi formerly classified as *Nectria*, subgenus *Hyphonectria*. **Men. N.Y.Bot.Gard.**, v.26 (1), p.1-126, 1976.

2.2.2 Ecologia

C. rosea é encontrado em diversas regiões do mundo: tropicais, temperadas, subárticas e até desérticas. Foi relatado em culturas, campo, matas, florestas, água doce e solos litorâneos, particularmente em locais com pH variando entre neutro e alcalino. Intrigantemente, *C. rosea* é conhecido por colonizar raízes, hastes, vagens, e sementes de soja, raízes de trevo vermelho, folhas de morango e framboesa, sem produzir sintomas. Algumas pesquisas que investigam se *C. rosea* poderia ser patógeno de maçãs, tubérculos de batata, plântulas de coníferas, *Exacum affine*, e feijões de faba foram consideradas inconclusas, uma vez que não foram feitos estudos de isolamento e reinoculação do fungo (AL-HAMDANY e SALIH; ARIE et al.; HANSO e KAROLES; HUBER e FINLEY; IBNU e SUPRIANA; THERON e HOLZ, citados por SUTTON et al., 1997, p. 316)³. *N. ochroleuca*, o estado teleomorfo (fase sexuada) de *C. rosea*, é encontrado na maioria das vezes nos galhos de árvores recém mortas, mas também sobre tecidos jovens de plantas herbáceas e fungos. Possui hoje uma reputação distinta de micoparasita de um amplo espectro de fungos, o que demonstra sua natureza cosmopolita e sua extraordinária versatilidade ecológica (SUTTON et al., 1997).

2.3 MOFO CINZENTO – *Botrytis cinerea* Pers. & F

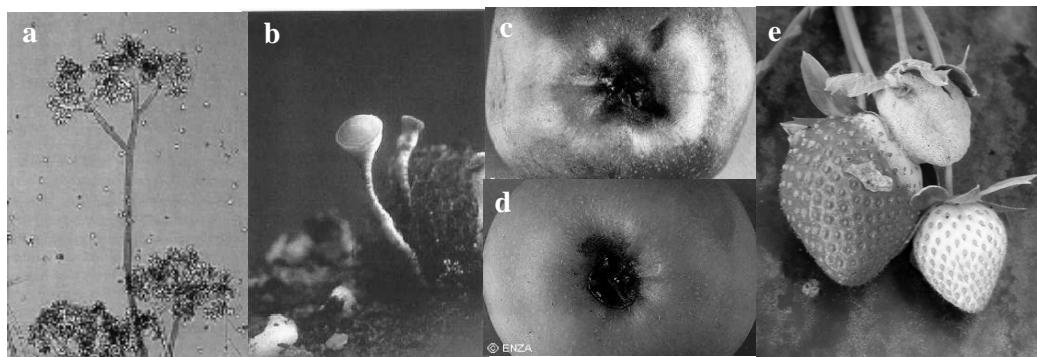
Botrytis cinerea Pers.Ex.Fr [teleomorfo: *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel] (Fig. 3 – a, b) é um patógeno de plantas necrotrófico, não especializado, encontrado em todo o mundo e que causa severas perdas em diversas culturas

² DOMSCH, K.H.; GAMS, W.; ANDERSON, T.H. **Compendium of soil fungi**. Academic Press, London, 1980.

³ AL-HAMDANY, M.A.; SALIH, M.M. Wilt causing fungi on broad bean. **Indian Phytopathology**, v.39, p.620-622, 1986. ARIE, T.; NAMBA, S.; YAMASHITA, S.; DOI, Y.; KIJIMA, T. Stem blight, a new disease of *Exacum* caused by *Nectria gliocladioides* Smalley et Hansen. **Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.**, v.53, p.570-575, 1987. HANSO, M.; KAROLES, K. Some agents of damping-off in conifer seedlings in Estonian forest nurseries and associated microfungi. **Metsanduslikud Uurim.**, v.16, p.120-134, 1980. HUBER, D.M.; FINLEY A.M. *Gliocladium roseum*, a causal agent in the bean root rot complex in Idaho. **Plant Dis. Rep.**, v.43, p.626-628, 1959. IBNU, Z.; SUPRIANA, N.; Inventory of diseases at three *Pinus merkusii* nurseries in North Sumatra. **Bul. Penelitian Kehutanan**, v.3, p.37-44, 1987. THERON, D.J.; HOLZ, G. Dry rot of potatoes caused by *Gliocladium roseum*. **Plant Pathol.**, v.40, p.302-305, 1991.

(JARVIS citado por LI et al., 2002, p. 211)⁴. O mofo cinzento causado por ele ataca uma grande variedade de frutas, vegetais e plantas ornamentais cultivadas em estufas (SURGEONER, 1998), como rosas (MORANDI et al., 2003), sementes de coníferas, violetas, ciclame, gerânio, crisântemos, begônias, framboesa, pêra (Fig. 3 – c), maçã (Fig. 3 – d), pepino, pimentão (SUTTON et al., 1997), uva, morango (Fig. 3 – e) (VALDEBENITO-SANHUEZA et al., 1997), (SUTTON et al., 1997) e tomate (SALIGKARIAS; GRAVANIS; EPTON, 2002), (SUTTON et al., 1997), culturas que usam muitos agrotóxicos.

FIGURA 3 - *Botrytis cinerea*



(a) Conídios e conidióforos; (b) Estágio teleomorfo de *Botrytis*: *Botryotinia fuckeliana*; (c) Lesão causada em maçã; (d) Lesão causada em pêra; (e) Propagação do mofo cinzento em morango pelo contato fruto a fruto

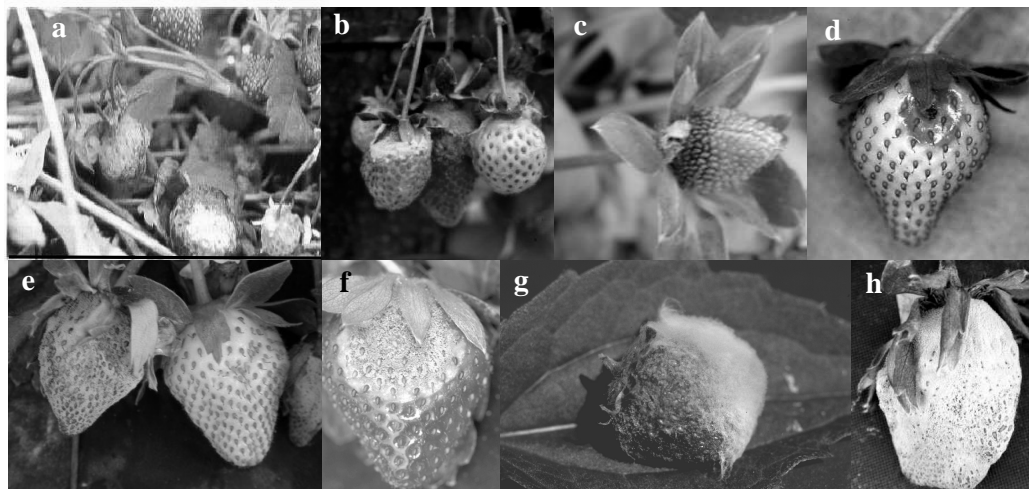
FONTE: (a) (b) (PENG; WALKER; SUTTON, 2003) / (c) (d) (MANNING; ALBERT; PERCY, 1997) / (e) (LEGARD; MERTELY, 2000)

No morangueiro, a podridão do fruto causada por *Botrytis cinerea* é uma das mais importantes doenças (Fig. 4a, 4b), reduzindo a produtividade e a qualidade dos frutos e requerendo freqüentes aplicações de fungicidas para manter o controle (BOFF et al., 2003), (BERRIE, 2000), (LEGARD; MERTELY, 2000), (KOVACH; PETZOLDT; HARMAN, 2000). Ela é bastante comum, ocorre em todas as regiões do mundo onde se cultiva o morangueiro e sempre causa grandes prejuízos pois reduz

⁴ JARVIS, W.R. *Botryotinia and Botrytis Species: Taxonomy, Physiology and Pathogenicity*. Agriculture Canada, Hignell Printing, Limited, 195p., 1977.

diretamente o produto comercial, podendo causar perdas de 50% ou mais na produção (SURGEONER, 1998).

FIGURA 4 - MOFO CINZENTO CAUSADO POR *Botrytis cinerea* EM MORANGO



(a) (b) Podridão do fruto causada por *B. cinerea*; (c) Sintomas em fruto imaturo; (d) Podridão inicial em fruto verde - mancha marrom clara com consistência mole mas não aquosa; (e) Podridão evolui por todo o fruto e ele apodrece completamente; (f) Lesão esporulada em fruto maduro, coberta por massa de esporos (conídios); (g) Fruto no estágio final da doença, seco e firme, externamente é recoberto por um bolor cinzento; (h) Frutos podem se tornar mumificados

FONTE: (a) (PENG; WALKER; SUTTON, 2003) / (b) (FISHER, 2002) / (c) (d) (e) (f) (h) (LEGARD; MERTELY, 2000) / (g) (PRITTS, 2003)

Apesar de atacar todas as partes do morangueiro que estão acima do solo, *B. cinerea* é mais importante como podridão do fruto, em pré e pós-colheita. O fungo passa o inverno como micélio sobre as folhas mortas, frutos mumificados e escombros no canteiro, e na primavera esporula, dando origem a esporos durante períodos de alta umidade, os quais são carregados pelo vento e pela água da chuva (BERRIE, 2000).

A principal via pela qual o fungo infecta os frutos são as flores. Elas são susceptíveis a infecção após a abertura (BOFF et al., 2003). A infecção nos estames pode resultar no estabelecimento do *B. cinerea* no receptáculo, enquanto pistilo, cálice (sépalas) e pétalas aparentemente não estão envolvidos diretamente (BOFF et al., 2003). O patógeno permanece quiescente no receptáculo até o amadurecimento do fruto podendo causar podridão antes ou após a colheita (BOFF et al., 2003), sendo que a podridão se desenvolve rapidamente quando os frutos começam a amadurecer

(BERRIE, 2000). Além da sua importância no estabelecimento de infecções latentes, as partes florais do morango também podem ser a fonte de inóculo para infecções diretas nos frutos. As infecções nos frutos frequentemente iniciam a partir de pétalas mortas aderidas à superfície dos frutos, ou presas entre o fruto e o cálice (BOFF et al., 2003). Assim, partes senescentes das flores são importantes fontes de micélio, o qual pode invadir o fruto em desenvolvimento, dando origem a característica podridão na extremidade do cálice (BERRIE, 2000).

A disseminação do patógeno na lavoura ocorre através de esporos carregados pelo vento, água da chuva, irrigação, insetos, implementos e ferramentas agrícolas, e pelo contato com frutos contaminados. Os frutos podem ser afetados em qualquer estágio de desenvolvimento (Fig. 4c, 4d, 4e, 4f). No início, a podridão se apresenta como mancha de tamanho variável, de cor marrom claro, com consistência mole mas não aquosa (Fig. 4d), que evolui rapidamente por todo o fruto, apodrecendo-o completamente. Este, finalmente, apresenta-se seco e rígido externamente, recoberto por um bolor cinzento (Fig. 4g). Eventualmente, os frutos podem se tornar mumificados (Fig. 4h). O fungo afeta também flores, pedúnculos, cálices e mesmo folhas, onde produz lesões com características semelhantes às do fruto (RONQUE, 1998).

As condições propícias para o aparecimento da doença no fruto são alta umidade relativa, ventos e temperatura ao redor de 18 a 23 °C – mas também se mantém ativo mesmo a 0 °C. Além disso, causa deterioração em morangos após a colheita, sendo que em produtos embalados a deterioração se propaga pelo contato fruto a fruto (RONQUE, 1998).

Atualmente, o método convencional para o controle do mofo cinzento envolve uma série de aplicações de fungicidas durante o período floral (BOFF et al., 2003) (VALDEBENITO-SANHUEZA et al., 1997). Estas aplicações também atingem as pétalas, o que contribui adicionalmente para o controle. Fungicidas reduzem a colonização das pétalas quando aplicados preventivamente, isto é, antes do estabelecimento do inóculo de *B. cinerea*, visto que os efeitos dos fungicidas após a infecção são pequenos. O melhor período para aplicação dos fungicidas para controlar

esta fonte de inóculo é durante o florescimento, embora as pétalas aumentem a infecção nos frutos somente mais tarde, durante o desenvolvimento destes (BOFF et al., 2003).

Porém, o controle químico tem se tornado muito difícil devido ao desenvolvimento de linhagens resistentes (FOKKEMA, 1993), (SALIGKARIAS; GRAVANIS; EPTON, 2002) bem como o aumento da preocupação dos consumidores no que diz respeito ao uso de agroquímicos (SALIGKARIAS; GRAVANIS; EPTON, 2002), (BERRIE, 2000). Isto implica na necessidade de explorar estratégias alternativas para o controle (BERRIE, 2000).

A abundante esporulação de *B. cinerea* em tecidos vegetais mortos ou senescentes contribui para o desenvolvimento e a manutenção da epidemia dentro da cultura. Sendo assim, a supressão da esporulação do patógeno é uma potencial estratégia de controle biológico (MORANDI et al., 2003).

2.4 *Clonostachys rosea*: UM POTENTE ANTAGONISTA PARA *Botrytis cinerea*

Dentre os agentes de controle biológico testados para controlar *Botrytis cinerea*, o fungo filamentoso *Clonostachys rosea* surgiu como um eficaz e versátil antagonista em estudos no final da década de 80 (SUTTON et al., 1997), (SURGEONER, 1998), (PENG; SUTTON; KEVAN, 1992). *Clonostachys* tem gerado grande interesse entre produtores e pesquisadores nos diversos países onde ele ocorre, entre eles o Brasil (SURGEONER, 1998). Testes comerciais na América do Sul e pesquisa no Canadá e nos EUA sugerem que *Clonostachys rosea* é uma alternativa viável ao uso de fungicidas para o controle de *Botrytis* (SURGEONER, 1998).

Na verdade, este promissor agente de biocontrole do mofo cinzento está sendo estudado para ser utilizado contra diversos patógenos em diferentes culturas, e em sua maioria, tem demonstrado alta eficiência (Tab. 1) (SUTTON et al., KÖHL et al., citados por LI et al., 2002, p.211)⁵. Isolados de *Clonostachys* são superiores a mais de

⁵ SUTTON, et al, 1997. (ver Referências) KÖHL, J.; GERLAGH, M.; de HAAS, B.H.; KRIJGER, M.C. Biological control of *Botrytis cinerea* in cyclamen with *Ulocladium atrum* and *Gliocladium roseum* under commercial growing conditions. **Phytopathology**, v.88, p.568-575, 1998.

1.200 microrganismos já avaliados, e atuam tão efetivamente ou melhor que muitos fungicidas em testes de campo e ensaios conduzidos em estufas (SURGEONER, 1998). Em Ontário – Canadá, *Clonostachys rosea* é o principal agente de biocontrole testado para o desenvolvimento de um produto comercial contra *Botrytis* em pequenas frutas, flores e culturas feitas em estufas, pois produz inóculo em grande quantidade, viável a longo prazo, composto por esporos aderentes que facilitam o manuseio e diminuem o risco de dispersão no ambiente. Além disso, o uso do *C. rosea* não causa nenhum risco ecológico pois ele encontra-se distribuído naturalmente tanto nas plantas quanto no solo, não somente em Ontário mas também em muitas outras regiões do mundo (SURGEONER, 1998).

A pesquisa para substituição do controle químico de *B. cinerea* no morangueiro tem sido feita em vários países, propondo-se o biocontrole para diminuir o risco de presença de resíduos de fungicidas nos frutos. No caso desta doença, para obter controle, recomendam-se aplicações de fungicidas para proteger principalmente as flores. No entanto, as flores desenvolvem-se durante longos períodos, os quais coincidem com a formação e maturação dos frutos e, portanto, com a pulverização dos morangos (VALDEBENITO-SANHUEZA et al., 1997).

No caso da cultura do morango ele foi selecionado por fazer parte da flora natural que coloniza folhas e partes florais e tem mostrado, em condições controladas e de campo, com diferentes métodos de aplicação, excelente proteção das plantas e consistente redução de perdas causadas por *B. cinerea* em vários cultivares (SUTTON, citado por VALDEBENITO-SANHUEZA et al., 1997, p. 70)⁶.

Em pesquisas feitas em folhas unidas ou não unidas a planta, pétalas e estames de morango, o antagonista suprimiu regularmente mais de 98% de *B. cinerea*. Seu desempenho foi tão bom ou melhor que outros microrganismos, como *Trichoderma viride*, *Alternaria alternata*, *Myrothecium verrucaria* e *Penicillium* spp., e um fungicida padrão (Captan) (SUTTON et al., 1997). Nota-se ainda que a colonização das pétalas por *B. cinerea* pode ser prevenida ou reduzida pela ação de *C. rosea*, o que indica que este agente de biocontrole é uma alternativa promissora para proteger as

pétalas contra *B. cinerea* durante o resto do período de crescimento, visto que as aplicações de fungicida oferecem proteção somente por um período limitado (BOFF et al., 2003).

Em testes para comparar a eficiência de *C. rosea* e do fungicida Captan na proteção das flores do morango - principal via de invasão do fruto pelo *B. cinerea*, o fungo (10^6 esporos/mL) suprimiu a incidência de *B. cinerea* em estames de 93% para 79% e em frutos de 76% para 48%, uma performance igual ou melhor que outros antagonistas e o fungicida. *C. rosea* foi mais eficaz que Captan contra *B. cinerea* em frutos de 8 diferentes cultivares de morango. Os tratamentos foram aplicados aos vasos ao amanhecer e antes do anoitecer, baseados na conjectura que orvalho e escuro podem facilitar a sobrevivência e a atividade dos organismos de biocontrole (SUTTON et al., 1997).

Aplicações semanais de *C. rosea* (10^6 esporos/mL) também proporcionaram um bom controle de *B. cinerea* em morangueiros da variedade Chandler cultivados em estufas num clima extremamente úmido nas montanhas da Serra Gaúcha no sul do Brasil. Perdas de frutos durante a colheita foram de 27% em morangos tratados com *C. rosea* comparado com 36% obtidos por um programa semanal de aplicação de fungicida. Nas avaliações feitas no quarto ou quinto dia após a colheita as perdas foram de 52% com o tratamento com *C. rosea* e de 64% para o tratamento com fungicida. (SUTTON et al., 1997).

⁶ SUTTON, J.C. Evaluation of micro-organisms for biocontrol: *Botrytis cinerea* and strawberry, a case study. **Advances in Plant Pathology**, v.2, New York, Academic Press, p. 173-190, 1995.

(Continua)

TABELA 1 - EXEMPLOS DE APLICAÇÃO DE *C. rosea*

Cultura	Objetivo da pesquisa	Local	Resultados	Referência
Sementes de cereais	Tratar sementes	Campo e laboratório	Formulado de <i>C. rosea</i> produzido com baixo custo tem vida de prateleira > 1 ano em T < 20 °C, mantendo eficácia no controle	(MILJØPROJEKT, 1999)
Sementes de coníferas; morango e framboesa cultivados no campo; <i>black spruce</i> , rosa, begônia, gerânio, ciclame, poinsettia (flor da Páscoa), violeta persa (<i>Exacum affine</i>), hortênsia, tomate, pepino e pimentão cultivados em estufas	Revisar trabalhos que comprovam que <i>C. rosea</i> é um versátil antagonista de <i>B. cinerea</i>	Campo e laboratório	<i>C. rosea</i> foi igual ou mais eficaz que tratamentos com fungicida em folhas, brácteas, caules, flores e frutos.	(SUTTON et al., 1997)
Roseira	Investigar a capacidade de <i>C. rosea</i> controlar <i>B. cinerea</i> em condições ambientais comerciais	Campo (estufa comercial)	<i>C. rosea</i> suprimiu esporulação de <i>B. cinerea</i> em folhas e pétalas de rosa e colonizou folhas de roseira em diferentes condições de microclima.	(MORANDI et al., 2003)
Resíduos de folhas de roseira artificialmente infestados com <i>B. cinerea</i>	Testar fungos filamentosos, bactérias e leveduras contra <i>B. cinerea</i>		<i>C. rosea</i> reduziu esporulação do patógeno em > 90 %	(TATAGIBA et al., 1998)
Plantas ornamentais e vegetais cultivados em casa de vegetação, folhas, caules e flores	Realizar pré-seleção de fungos filamentosos (<i>C. rosea</i> , <i>Trichoderma koningii</i> e <i>Trichoderma harzianum</i>) para controle de <i>B. cinerea</i>		Agentes de biocontrole foram tão ou mais eficazes que tratamentos convencionais com fungicidas, exceto quando T < 10 °C. Os antagonistas foram altamente eficazes quando a concentração do inóculo foi = ou > que a do patógeno. Os agentes suprimiram <i>B. cinerea</i> em ferimentos de gerânios podados; queimaduras causadas pelo sol em <i>Exacum spp.</i> ; ferimentos causados pela desfolha em tomate; e em pétalas caídas que o patógeno utiliza como alimento base para atacar folhas, caules e frutos	(SUTTON, 2002)

(Continuação)

Cacau	Avaliar microrganismos para controle de monilíase, vassoura de bruxa e podridão morena	Campo	O tratamento com a estirpe G-4 de <i>C. rosea</i> não reduziu a incidência de monilíase, mas a mistura dele com outros antagonistas proporcionou controle das outras doenças	(KRAUSS; SOBERANIS, 2002)
Cebola	Aplicar <i>C. rosea</i> para testar sua capacidade de suprimir a esporulação de <i>Botrytis spp.</i> em condições de campo	Laboratório e campo	<i>C. rosea</i> suprimiu esporulação de <i>B. aclada</i> em folhas mortas de cebola em câmara úmida. No campo, não teve efeito sobre a epidemia de mancha das folhas da cebola. O antagonista não pode ser reisolado a partir de folhas necróticas, diferente do que ocorre em morango.	(KÖHL et al., 1995)
Roseira	Investigar se infestações de afídios e pulgões interferem no controle de <i>B. cinerea</i> por <i>C. rosea</i>	Laboratório	Infestações de afídios e pulgões não comprometem a habilidade de <i>C. rosea</i> suprimir a produção de inóculo de <i>B. cinerea</i> em folhas	(MORANDI; SUTTON; MAFFIA, 2000)
Sementes de cevada	Testar o tratamento de sementes de cevada com <i>C. rosea</i> , a sobrevivência dos esporos e a eficiência no controle da ferrugem nestas sementes	Laboratório e campo	Sobrevivência de esporos de <i>C. rosea</i> em sementes de cevada estocadas, estimada como número de cfu/semente, foi afetada pelos métodos usados para produzir inóculo, método de empacotamento das sementes tratadas (material, sílica gel) e temperatura usada para estocagem das sementes. Aumento na sobrevivência, especialmente a 20 °C, foi alcançado pelos esporos de <i>C. rosea</i> produzidos em meio sólido, oposto ao meio líquido, e pelo aumento do período de produção de inóculo de 12 para 20 dias	(JENSEN; KNUDSEN; JENSEN, 2002)
Tomate hidropônico	Testar a habilidade de <i>C. rosea</i> em colonizar e persistir nas porções dos caules de tomates hidropônicos que foram desfolhadas e de suprimir a esporulação de <i>B. cinerea</i>	Casa de vegetação comercial	<i>C. rosea</i> suprimiu <i>B. cinerea</i> de forma tão ou mais eficiente que Iprodione (fungicida tradicional) sem exceção, ele persistiu e suprimiu a esporulação do patógeno por 11 semanas após a aplicação.	(SUTTON et al., 2002)
Tomate hidropônico	Estudar a eficácia de <i>C. rosea</i> em plantas de tomate estressadas e não-estressadas bem como sua interação com <i>B. cinerea</i>	Casa de vegetação e laboratório	A colonização e a esporulação tanto do patógeno quanto do hospedeiro são promovidas em condição de baixa intensidade de luz.	(SHAFIA et al., 2001)

C. rosea atua efetivamente contra *B. cinerea* não somente nas flores e frutos, mas também folhas do morangueiro, a principal fonte de inóculo do patógeno nessa cultura (SUTTON et al., 1997). *C. rosea* suprimiu a produção de esporos de *B. cinerea* nas folhas de 90 a 100% e foi sempre mais eficaz que Chlorothalonil (um fungicida de excepcional eficácia contra *B. cinerea* nas folhas do morangueiro), em 6 testes de campo em Ontário – Canadá. Nas parcelas tratadas com *C. rosea* constatou-se o menor número de frutos afetados na maioria das avaliações. Não foram observadas frutificações de *C. rosea* nos frutos e, desta forma, os resultados obtidos confirmam o potencial desse organismo para o controle de *B. cinerea* em morangueiros (SUTTON et al., 1997) (FOKKEMA, 1993).

Com base nestes exemplos, nota-se que as principais características que têm estimulado o uso de *C. rosea* como agente de biocontrole de *B. cinerea* são:

- a) *C. rosea* atua por competição pelo substrato com o patógeno, colonizando folhas e outras estruturas e impedindo ou reduzindo o estabelecimento de *B. cinerea* (SUTTON, citado por VALDEBENITO-SANHUEZA et al., 1997, p. 70)⁷, além disso, atua como um micoparasita, sendo que estudos por microscopia eletrônica de varredura revelam que a infecção dos esporos e tubos germinativos de *B. cinerea* ocorre através de penetração direta pelas pontas das hifas de *C. rosea* (LI et al., 2002);
- b) *C. rosea* faz parte da microflora natural da cultura e, portanto, é adaptado às condições em que se cultiva o morangueiro;
- c) *C. rosea* não atua por antibiose, não se desenvolve à temperatura de 37 °C e tem baixa toxicidade, fatores requeridos para sugerir a inocuidade do organismo ao homem;
- d) *C. rosea* não se dispersa sem auxílio de respingos de água e, portanto, em estufas não contamina o ar;
- e) *C. rosea* não coloniza eficientemente os frutos (SUTTON, citado por VALDEBENITO-SANHUEZA et al., 1997, p. 70)⁷.

⁷ SUTTON, J.C. Evaluation of micro-organisms for biocontrol: *Botrytis cinerea* and strawberry, a case study. **Advances in Plant Pathology**, v.2, New York, Academic Press, p. 173-190, 1995.

2.5 TÉCNICAS UTILIZADAS PARA A PRODUÇÃO DE *C. rosea*

A produção de esporos de *C. rosea* é feita, na maioria dos trabalhos, de acordo com a metodologia descrita por SUTTON e YU (1994), segundo a qual *C. rosea* cresce sobre grãos de trigo durante 35 dias em média, em uma temperatura que varia de 20 a 23 °C. Após um período inicial de crescimento do micélio (14 a 18 dias), culturas são secadas lentamente, um processo que promove a produção de hifas com conidióforos penicilados, que produz mais esporos que os conidióforos verticilados (SUTTON et al., 1997).

Atualmente, outros substratos e condições estão sendo testados (Tab. 2) mas nenhum destes trabalhos tem como objetivo a otimização sistemática da produção de *C. rosea*, limitando-se apenas a modificações da metodologia tradicional que também foram funcionais.

(Continua)
TABELA 2 - PRODUÇÃO DO AGENTE DE BIOCONTROLE *C. rosea* EM DIFERENTES CONDIÇÕES

Substrato	Período	Temperatura	<i>C. rosea</i> produzido	Outras condições	Referência
Grãos de trigo estéreis	35 dias	20 a 23 °C	1 a 5 x 10 ⁹ esporos/g	Após 14-18 dias de crescimento micelial, culturas foram secadas lentamente para produção de esporos	(SUTTON et al., 1997)
Grãos de trigo estéreis		22 °C	10 ⁹ esporos/g	Após ser colonizado pelos fungos, os grãos foram lentamente secos com ar por 15 dias a 22-25 °C.	(MORANDI et al., 2003)
				Esporos foram obtidos sobre centeio, girassol e farelo de trigo.	
Grãos de trigo estéreis	20 dias	24 a 25 °C		Iluminação contínua.	(VALDEBENTO-SANHUEZA et al., 1997)
BDA (batata dextrose ágar)	2-3 semanas	20 °C		Sob luz fluorescente.	(LI et al., 2002)
Grãos de trigo estéreis	30 dias	24 °C	43 x 10 ⁸ esporos/g	Perpendiculares à fonte de luz – lâmpadas fluorescentes tipo luz do dia, 20 W	(DALL'ONDER, 1997)
Fermentação em 2 etapas: líquida (FL) e em estado sólido (FES)	15 dias	24 °C	superior a 10 ⁷ cfu* ml ⁻¹	FL: água destilada esterilizada com 3 % melaço e 0,5 % extrato de levedura cervejeira, shaker orbital a 100 rpm por 5 dias. FES: sacolas de polipropileno com arroz. Ambiente sob luz fluorescente.	(KRAUSS; SOBERANIS, 2002)
Grãos de trigo estéreis	14 dias	18 °C			(KÖHL et al., 1995)

(Continuação)

BDA (batata dextrose ágar)	20-22 °C.		Sob lâmpadas fluorescentes luz fria (12 h fotoperíodo)	(MORANDI; SUTTON; MAFFIA, 2000)
Mistura de turfa, farelo de trigo e água (15:26:59, w/w/w)	21 ± 3 °C	5-7 x 10 ⁸ cfu g ⁻¹	Após 14 dias de incubação a formulação turfa/farelo foi espalhada em uma fina camada em papel filtro esterilizado e seca por 2 dias em câmara de fluxo laminar a 21 ± 3 °C	(JENSEN; KNUDSEN; JENSEN, 2002)
Caldo esterilizado de batata dextrose	21 ± 3 °C	8 dias	Shaker rotatório a 130 rpm. Após 24 h de incubação, 6 ml de polyethylene glycol 200 foi adicionado a cada frasco.	(JENSEN; KNUDSEN; JENSEN, 2002)
Grãos de trigo estéreis	20-30 °C	30 dias.	Garrafas Mason foram agitadas a cada 2-3 dias para evitar entrelaçamento dos grãos pelo micélio e tampas foram afrouxadas por 3 s no 4° e 8° dia para permitir troca de ar. No 12° dia, quando os grãos estavam cobertos pelo micélio a tampa de metal das garrafas foi substituída por papel de fotocópia esterilizado para permitir que as culturas sequem lentamente e promover a produção de esporos.	(SUTTON et al., 2002)
BDA (batata dextrose ágar)	20-22 °C.		Sob lâmpadas fluorescente luz branca fria (12 h fotoperíodo).	(SHAFIA et al., 2001)
BDA (batata dextrose ágar), pH 7,0	20-23 °C	15-20 dias	Sob lâmpadas fluorescentes luz branca fria (14 h fotoperíodo), seco com ar por 2 dias.	(PENG; SUTTON; KEVAN, 1992)
Farinha de milho, farelo usado para alimentar aves domésticas, farelo de trigo e farelo de aveia	20-23 °C	15 dias	Garrafas, com as tampas desapertadas, foram mantidas na bancada por 3 dias, após isto os substratos infestados foram transferidos para bandejas plásticas esterilizadas cobertas com filme plástico transparente e mantidas sob lâmpadas fluorescentes. Depois o filme foi removido e os substratos fossem secos com ar por 2 dias.	(PENG; SUTTON; KEVAN, 1992)

* cfu = colony forming unit

2.6 AVALIAÇÃO DO ESTADO DA LITERATURA

Na literatura não foi encontrada nenhuma informação significativa sobre as condições ideais de cultivo do microrganismo *C. rosea*. Existem alguns métodos de produção relatados, no entanto, não existem informações detalhadas que justifiquem os procedimentos adotados. Provavelmente os autores optaram por utilizar um sistema previamente conhecido, que fornecia resultados aceitáveis, sem realizar experimentos para verificar se este método era realmente o mais eficaz. Isto está relacionado ao fato de que a maioria dos trabalhos visa a realização de testes de campo para comprovar a eficácia do agente. Neste caso o objetivo é simplesmente ter material suficiente para testar, não importando se o processo de produção é ou não eficiente. Poucos trabalhos citam maneiras de melhorar a produção, geralmente restritas ao uso de substratos diferentes, mas nenhum estuda a cinética do processo de produção visando otimizá-la. É necessário elucidar quais as condições de cultivo permitem obter uma produção maior, mais eficiente e barata. Para isso é necessário definir qual o melhor meio de cultivo e quais as condições de temperatura, umidade, aeração e agitação mais adequadas.

3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

O objetivo geral desta dissertação é otimizar a produção de esporos de *Clonostachys rosea* para uso no controle biológico do fungo *Botrytis cinerea*, causador do mofo cinzento no morangueiro, baseando-se na utilização de grãos através de técnicas de fermentação em estado sólido (FES). Optou-se pela FES pois este processo fornece vantagens como baixo custo, praticidade e fácil execução. Fornece também esporos mais resistentes às condições extremas do meio ambiente e mais virulentos (MILJØPROJEKT, 1999), (MORIN, 1992). Assim, essa é a tecnologia ideal para ser transferida diretamente ao produtor rural, que poderá produzir seu biofungicida de uma maneira simples e de baixo custo, para aplicar na cultura do morangueiro.

O trabalho enfoca estudos da cinética de crescimento, estudos da cinética de produção de esporos e a otimização do processo, selecionando meios de cultivo alternativos e elucidando os efeitos das condições ambientais. A necessidade de tais estudos é justificada pela falta de qualquer estudo de cinética ou otimização das condições de cultivo na literatura, onde todos os estudos utilizam um “protocolo pronto não-otimizado”. Os experimentos que levaram os autores originais a escolher seus protocolos não estão disponíveis na literatura, e, além disso, não há nenhuma indicação de que estudos comparativos foram feitos na época.

Baseado nisto, definiram-se os seguintes objetivos específicos e as estratégias necessárias para alcançá-los:

- a) *elucidar a cinética básica de crescimento micelial considerando os efeitos da temperatura e fotoperíodo;*

Esta etapa inicial tem como metas (1) avaliar os efeitos de diferentes condições de temperatura e do fotoperíodo sobre o crescimento micelial do fungo *C. rosea* de forma qualitativa (coloração e aspectos morfológicos) e quantitativa (velocidade de crescimento), e (2) identificar condições ótimas desses dois fatores para serem utilizadas como condições padrões nas próximas etapas.

- b) *definir um protocolo para avaliação dos experimentos de produção de esporos;*

Antes de iniciar o estudo da cinética de produção de esporos é necessário definir um protocolo para sua avaliação. Nesta etapa são feitos estudos para definir (1) a cinética de liberação de esporos, visando determinar o melhor método para recuperação e contagem dos esporos; (2) o tempo de produção de esporos em placas de Petri para inóculo, para determinar o período ótimo de incubação destas placas que permita obter elevadas quantidades de esporos e (3) a forma de obtenção das amostras - com ou sem mistura prévia, para estabelecer uma forma mais fidedigna de representar a quantidade média de esporos produzida num recipiente.

c) elucidar a cinética de produção de esporos;

Nesta etapa é realizado o ajuste de modelos cinéticos empíricos aos dados por regressão não linear com intuito de selecionar a melhor equação, permitindo um melhor planejamento dos tempos de amostragem nos estudos posteriores. Para isso *C. rosea* é cultivado em grãos de trigo em frascos de Erlenmeyer, visto que este é o substrato mais utilizado de acordo com a revisão realizada (Tab. 2).

d) selecionar um meio de cultivo adequado à produção de esporos;

Na literatura foram encontrados alguns substratos diferentes mas sem nenhuma justificativa razoável para seu uso. A finalidade principal desta etapa é testar meios de cultivo alternativos como grãos de trigo, arroz branco e arroz integral, utilizando diferentes teores iniciais de umidade do meio, dado que o valor ótimo do teor de água inicial pode variar de substrato para substrato. A seleção do meio a ser usado nos estudos posteriores baseia-se nos critérios de (1) maior produtividade de esporos e (2) propriedades desejáveis do substrato para não comprometer a produção (por exemplo, o substrato não deve ser pegajoso demais).

e) otimizar as condições de cultivo no substrato selecionado;

Esta etapa visa avaliar o efeito de algumas variáveis sobre o crescimento: (1) teor inicial de água, (2) concentração inicial de inóculo, (3) condições de aeração e (4) regime de agitação. Nenhum estudo referente à caracterização destas variáveis foi encontrado na literatura.

f) testar o cultivo em sacos plásticos.

O objetivo final é desenvolver um sistema de “produção artesanal” acessível aos produtores, sendo escolhido o sistema de cultivo em sacos plásticos. Assim, é necessário estudar a produção em sacos utilizando as condições identificadas nas etapas anteriores.

Durante o trabalho notou-se que *C. rosea* apresenta diferentes cores do micélio em condições distintas de temperatura e fotoperíodo. Visto que alguns fungos como *Monascus anka* e *Monascus purpureus* (DIZON & SANCHEZ, citado por WIDJAYANTI, 1997)⁸ produzem pigmentos muito utilizados como corantes naturais e que não foi encontrado nenhum estudo na literatura que relatasse a caracterização de qualquer pigmento produzido por *C. rosea*, a caracterização do pigmento foi adicionada ao trabalho, visando assim elucidar a composição e a estrutura química do(s) pigmento(s) encontrado(s).

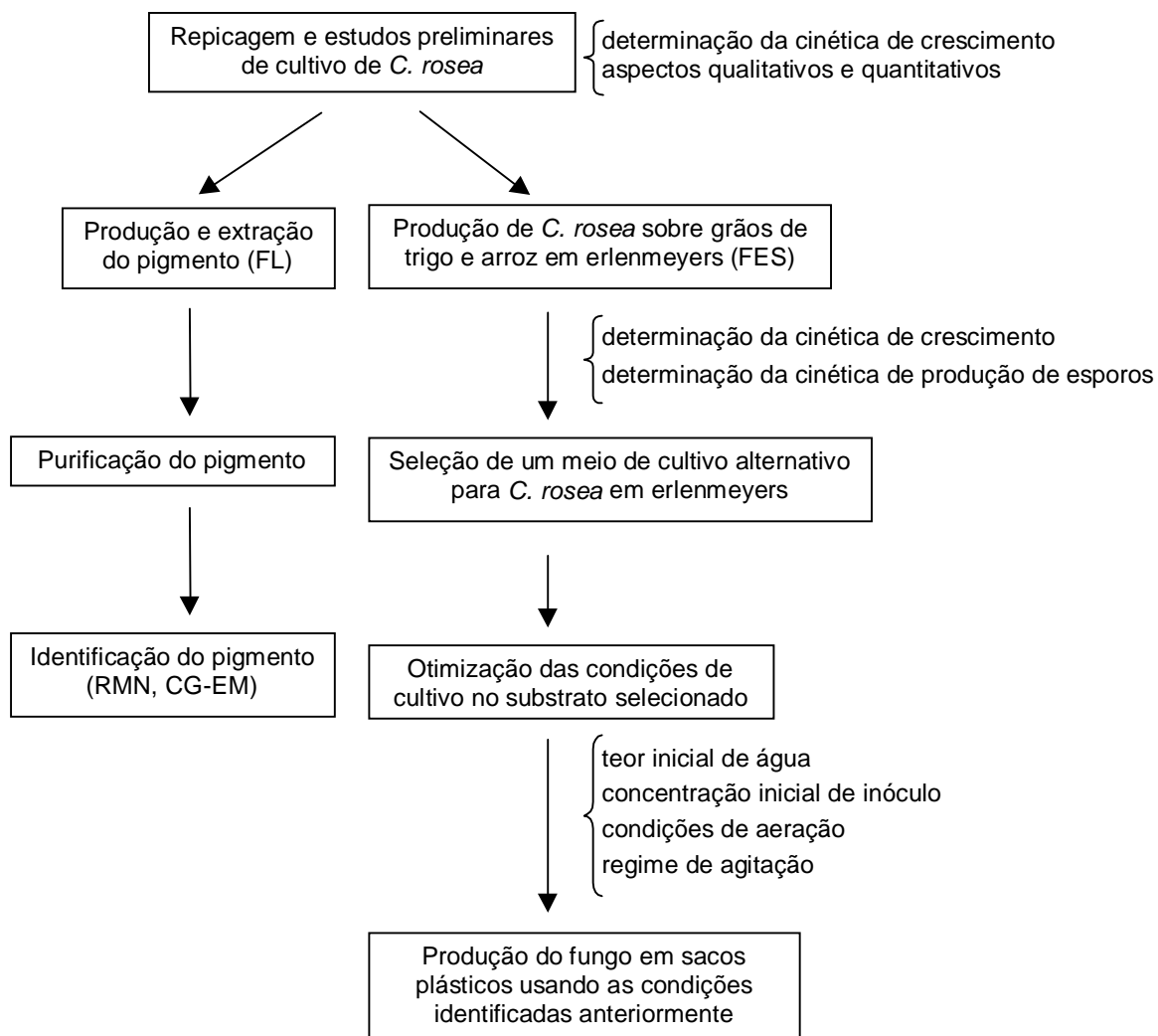
⁸ DIZON, E.I.; SANCHEZ, P.C. Potencial of *Monascus* pigments as coloring agent for banana sauce and tocino. **Philippine Agriculturist**, v.67, p.157-166, 1984.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ESQUEMA GERAL DE DISTRIBUIÇÃO DOS EXPERIMENTOS

Ao longo desta dissertação serão relatados os estudos realizados com o fungo *Clonostachys rosea*. A Figura 5 mostra o projeto de uma forma geral, permitindo visualizar de forma rápida quais os estudos relacionados em cada etapa.

FIGURA 5 - FLUXOGRAMA GERAL DA ESTRATÉGIA DE TRABALHO



FONTE: O AUTOR

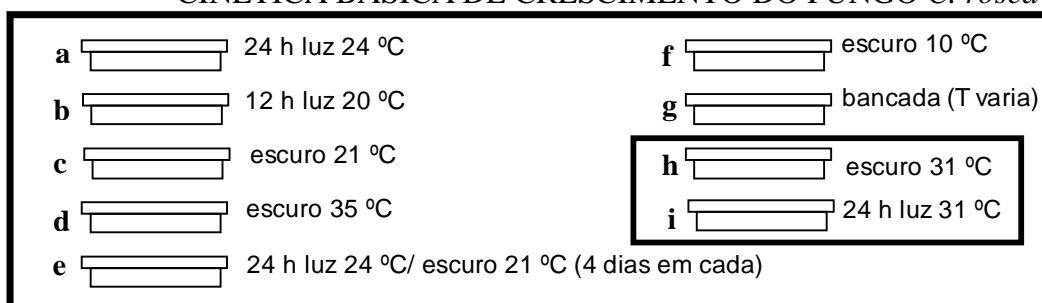
4.2 MANUTENÇÃO DA CULTURA

O microrganismo utilizado nos experimentos foi uma linhagem de *Clonostachys rosea* gentilmente cedida pela EMBRAPA Meio Ambiente, Jaguariúna/SP (procedência: Canadá). O repique das culturas foi realizado a cada 2 meses em placa de Petri com meio batata-dextrose-ágar (BDA) da marca BioBRÁS[®] Diagnósticos. Um disco de micélio, em meio BDA, de 0,5 cm de diâmetro foi colocado no centro da placa a ser colonizada. Os discos foram obtidos a partir do corte do micélio crescido em placa de Petri contendo meio sólido, utilizando um tubo de aço inoxidável com ponta afiada. Após o inóculo das placas, estas foram incubadas a 24 °C por 20 dias e armazenadas em geladeira a 4 °C.

4.3 PREPARO DE PLACAS DE PETRI PARA AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO MICELIAL

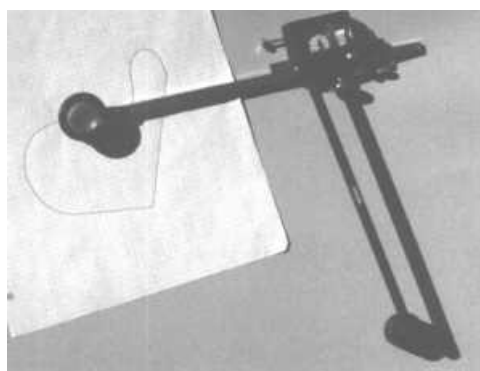
Focando o primeiro objetivo proposto, foi realizado um experimento para avaliar e elucidar a cinética básica de crescimento de *C. rosea* em diferentes condições de temperatura e fotoperíodo. O fungo foi repicado em placas de Petri plásticas esterilizadas contendo BDA, seguindo o procedimento utilizado para o repique da linhagem (seção 4.2), colocadas em diferentes condições de temperatura e fotoperíodo (quantidade de luz por dia), conforme esquema na Figura 6. As placas dos tratamentos **h** e **i** foram colocadas dentro de uma caixa de papelão para que fossem submetidas a mesma temperatura e fotoperíodos diferentes.

FIGURA 6 - ESQUEMA EXPERIMENTAL PARA AVALIAR E ELUCIDAR A CINÉTICA BÁSICA DE CRESCIMENTO DO FUNGO *C. rosea*



A avaliação do crescimento das colônias foi realizada através da medição da área destas a cada 2 dias, utilizando um Planímetro – aparelho utilizado para medir áreas planas e irregulares (Fig. 7). A cada 2 dias uma folha de transparência foi colocada sobre cada placa e foi feito o desenho da borda do crescimento do micélio, cuja área foi, posteriormente, medida pelo planímetro.

FIGURA 7 - PLANÍMETRO



4.4 TEMPO DE INCUBAÇÃO DAS PLACAS DE PETRI PARA PRODUÇÃO DE ESPOROS PARA INÓCULO

O preparo das placas utilizadas posteriormente para inóculo foi feito de acordo com o seguinte protocolo: (1) 2 discos de micélio, de 0,5 cm de diâmetro, foram retirados de uma cultura do fungo em BDA; (2) esses discos foram colocados em um tubo de ensaio contendo 10 mL de água destilada e Tween 20 (0,01%) previamente esterilizados e (3) em seguida a solução foi agitada e uma alíquota de 0,3 mL desta suspensão foi colocada em uma nova placa contendo BDA. Após inoculadas, as placas foram fechadas mas não foram seladas com filme de PVC, o que permitiu uma esporulação mais rápida. Elas foram incubadas a 24 °C e 24 h luz. Três placas foram amostradas diariamente, durante 13 dias, conforme protocolo descrito na seção 4.15.3, para avaliação da cinética de produção de esporos.

4.5 PREPARO DO INÓCULO

O preparo das placas utilizadas posteriormente para inóculo foi feito de acordo com o protocolo descrito na seção 4.4. Após inoculadas, as placas foram incubadas a 24 °C por 8 dias.

O inóculo constitui-se de uma suspensão de esporos feita a partir de uma destas placas. Para isso, adicionou-se 10 mL de água destilada esterilizada e, com o auxílio de uma espátula arame, fez-se a raspagem dos esporos da superfície do meio. Este procedimento foi repetido mais 3 vezes, perfazendo um total de 40 mL de inóculo por placa.

4.6 TEMPO DE AGITAÇÃO PARA LIBERAÇÃO DOS ESPOROS DOS GRÃOS DE SUBSTRATO

O preparo do inóculo foi feito de acordo com o protocolo descrito na seção 4.5. O meio de cultura consistiu de aproximadamente 10 g de arroz e 10 mL de água destilada colocados em erlenmeyers (250 mL). Na seqüência, estes erlenmeyers foram fechados com tampão de algodão e gaze e autoclavados por 15 minutos a 121 °C. Cada erlenmeyer com meio de cultura foi inoculado com 0,5 mL de uma suspensão de esporos de *C. rosea* ($2,0 \times 10^7$ esporos mL⁻¹). A seguir, foram colocados sob fonte de luz, a 24 °C e iluminação de lâmpadas fluorescentes, tipo “luz do dia” de 20 W. A tomada de amostra foi realizada conforme protocolo descrito na seção 4.15.2, para cinética de produção de esporos. Foram retiradas alíquotas de 2 mL em 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 e 60 minutos e, em seguida, procedeu-se a contagem dos esporos utilizando a Câmara de Neubauer (APÊNDICE 1).

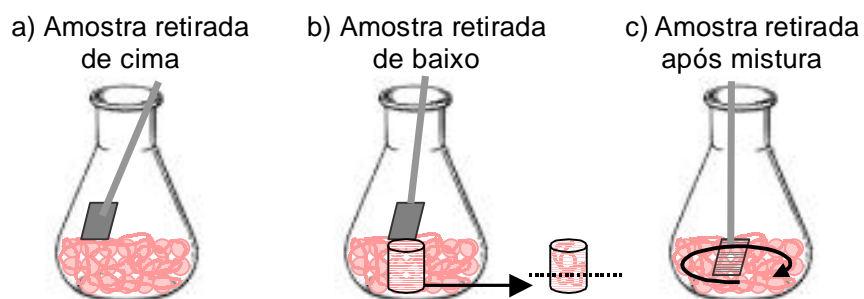
4.7 FORMA DE OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS EM ERLENMEYERS

O preparo do inóculo foi feito de acordo com o protocolo descrito na seção 4.5 de Material e Métodos. O meio de cultura consistiu de aproximadamente 100 g de arroz e 100 mL de água destilada colocados em erlenmeyers (500 mL). Na sequência estes erlenmeyers foram fechados com tampão de algodão e gaze e autoclavados por 15 minutos a 121 °C.

Cada erlenmeyer com meio de cultura foi inoculado com 5 mL de uma suspensão de esporos de *C. rosea* ($2,0 \times 10^7$ esporos mL⁻¹). A contagem dos esporos da suspensão foi feita em Câmara de Neubauer. A seguir, foram colocados sob fonte de luz, a 24 °C e iluminação de lâmpadas fluorescentes, tipo “luz do dia” de 20 W.

A tomada de amostra foi realizada conforme protocolo descrito nas seções 4.15.2 e 4.15.1, para cinética de produção de esporos e para determinação de peso seco. A amostragem foi realizada nos dias 0, 1, 2, 10, 11, e 12 após a inoculação, sacrificando-se um erlenmeyer por dia. Os erlenmeyers foram pesados e, a seguir, foram retiradas as amostras com auxílio de espátula. As amostras foram retiradas de três locais diferentes na seguinte ordem: 1º) de cima – através de raspagem (Fig. 8a); 2º) de baixo – através da retirada de um cilindro de substrato que permitiu que somente fosse utilizado o substrato da parte inferior do erlenmeyer (Fig. 8b); 3º) da mistura – procedeu-se a mistura de todo o substrato e posterior retirada da amostra (Fig. 8c).

FIGURA 8 - DIFERENTES LOCAIS DE OBTENÇÃO DA AMOSTRA



4.8 CARACTERIZAÇÃO DA CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *C. rosea* SOBRE GRÃOS DE TRIGO

O preparo do inóculo foi feito de acordo com o protocolo descrito na seção 4.5 de Material e Métodos. O meio de cultura consistiu de aproximadamente 10 g de trigo e 10 mL de água destilada colocados em erlenmeyers (250 mL). Na sequência estes erlenmeyers foram fechados com tampão de algodão e gaze e autoclavados por 15 minutos a 121 °C. Cada erlenmeyer com meio de cultura foi inoculado com 0,5 mL de uma suspensão de esporos de *C. rosea* ($2,0 \times 10^7$ esporos mL⁻¹). A seguir, foram colocados sob fonte de luz, a 24 °C e iluminação de lâmpadas fluorescentes, tipo “luz do dia” de 20 W. A tomada de amostra foi realizada conforme protocolo descrito na seção 4.15.2, para cinética de produção de esporos. Foram retiradas amostras a cada 5 dias durante 40 dias de fermentação. A contagem dos esporos foi feita em Câmara de Neubauer.

Utilizando regressão não linear, através do programa TKSolver (UTS Software – Rockford USA), foram aplicadas quatro equações de cinética – linear, exponencial, logística e desaceleração – a cada conjunto de dados, buscando a equação que melhor descrevesse o perfil experimental e, simultaneamente, para cada equação, o conjunto de parâmetros que permitisse um ajuste melhor da curva aos dados.

4.9 PREPARO DO MEIO DE CULTURA - METODOLOGIA GERAL

Os erlenmeyers (250 mL) foram inicialmente identificados e pesados. A seguir, foram colocadas aproximadamente 10 g de substrato (arroz integral tipo cateto ou arroz branco tipo agulhinha - não parbolizado) e 10 mL de água destilada em cada um e submeteu-se novamente a pesagem. Na sequência estes erlenmeyers foram fechados com tampão de algodão e gaze e autoclavados por 15 minutos a 121 °C.

Nos experimentos em que grãos de trigo foram utilizados como substrato foram testadas três diferentes formas de preparo inicial de substrato: 1) 10 g de grãos de trigo e 10 mL de água destilada foram colocados nos erlenmeyers que foram

fechados com tampão de algodão e gaze e submetidos a autoclavagem, durante a qual ocorreu o processo de cozimento; 2) inicialmente os grãos de trigo foram embebidos em água durante 6 h, a seguir foram fervidos durante 15 min, após eliminação da água excedente do processo de cozimento, 10 g de trigo foram colocados nos erlenmeyers, os quais foram fechados e submetidos a autoclavagem e 3) mesmo procedimento realizado em 2, mas com adição de mais 15 mL de água antes de fechar e autoclavar.

Todos os substratos utilizados nos experimentos deste trabalho são orgânicos, isto é, produzidos sem o uso de agroquímicos. Essa opção foi feita para evitar qualquer tipo de influência nos resultados, principalmente no que diz respeito a resíduos de fungicidas nos grãos utilizados, o que poderia afetar o desenvolvimento de *C. rosea*.

O preparo do inóculo foi feito de acordo com o protocolo descrito na seção 4.5 de Material e Métodos. Cada frasco foi inoculado com 0,5 mL de uma suspensão de $2,0 \times 10^7$ esporos mL⁻¹ de *C. rosea*. A contagem dos esporos da suspensão foi feita em Câmara de Neubauer. A seguir, os frascos foram colocados sob fonte de luz, a 24 °C e iluminação de lâmpadas fluorescentes, tipo “luz do dia” de 20 W.

A tomada de amostras foi realizada conforme protocolo descrito nas seções 4.15.2 e 4.15.1, para cinética de produção de esporos e para determinação de peso seco.

4.10 PRODUÇÃO DE ESPOROS EM DIFERENTES TEORES INICIAIS DE ÁGUA

Os erlenmeyers (250 mL) foram inicialmente identificados e pesados. A seguir, foram colocadas aproximadamente 10 g de substrato (arroz branco tipo agulhinha - não parbolizado) e quantidades diferentes de água destilada em cada um. A Tabela 3 apresenta as condições experimentais adotadas.

TABELA 3 - CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS UTILIZADAS

Teor de água inicial	Inóculo	Fotoperíodo	Temperatura
5 mL	0,5 mL	24 h luz	24 °C
7,5 mL	0,5 mL	24 h luz	24 °C
10 mL	0,5 mL	24 h luz	24 °C
15 mL	0,5 mL	24 h luz	24 °C

O terceiro tratamento (10 g arroz e 10 mL de água destilada) corresponde ao padrão utilizado nos experimentos anteriores. A seguir, os erlenmeyers foram novamente pesados, depois foram fechados com tampão de algodão e gaze e autoclavados por 15 minutos a 121 °C.

O preparo do inóculo foi feito de acordo com o protocolo descrito na seção 4.5 de Material e Métodos. Cada frasco foi inoculado com 0,5 mL de uma suspensão de 10^7 esporos mL^{-1} de *C. rosea*. A contagem dos esporos da suspensão foi feita em Câmara de Neubauer. A seguir, os frascos foram colocados sob fonte de luz, a 24 °C e iluminação de lâmpadas fluorescentes, tipo “luz do dia” de 20 W.

A tomada de amostras foi realizada conforme protocolo descrito nas seções 4.15.2 e 4.15.1, para cinética de produção de esporos e para determinação de peso seco.

4.11 PRODUÇÃO DE ESPOROS EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE AERAÇÃO

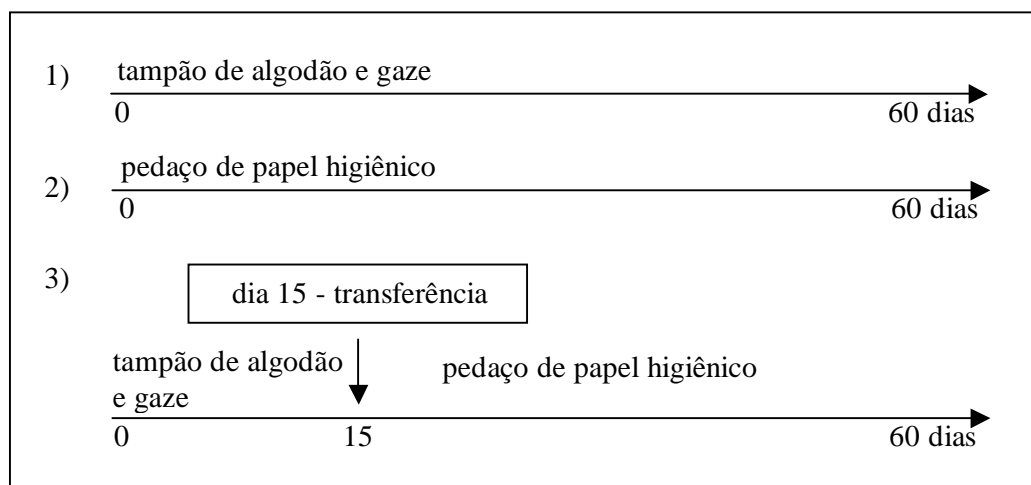
O preparo dos erlenmeyers foi feito conforme descrito na seção 4.9, utilizando 10 g de arroz branco tipo agulhinha - não parbolizado e 7,5 mL de água destilada. Na sequência estes erlenmeyers foram fechados com tampão de algodão e gaze e autoclavados por 15 minutos a 121 °C.

O preparo do inóculo foi feito de acordo com o protocolo descrito na seção 4.5 de Material e Métodos. Cada frasco foi inoculado com 0,5 mL de uma suspensão de 10^7 esporos mL^{-1} de *C. rosea*. A contagem dos esporos da suspensão foi feita em

Câmara de Neubauer. A seguir, os frascos foram colocados sob fonte de luz, a 24 °C e iluminação de lâmpadas fluorescentes, tipo “luz do dia” de 20 W.

Para observar o efeito de diferentes condições de aeração sobre a produção de esporos, foram testadas formas diferentes de fechar os erlenmeyers: 1) utilizando tampões de algodão e gaze (padrão utilizado nos experimentos anteriores) durante os 60 dias de fermentação; 2) utilizando um pedaço de papel higiênico durante os 60 dias de fermentação; 3) utilizando tampões de algodão e gaze durante os 15 primeiros dias de fermentação e depois substituindo esses tampões por pedaços de papel higiênico não esterilizados (Fig. 9). O uso de papel higiênico aumenta a disponibilidade de oxigênio e favorece uma secagem mais rápida (perda de umidade) do meio porque representa uma barreira menor à difusão de oxigênio e vapor.

FIGURA 9 - ESQUEMA DO EXPERIMENTO DE PRODUÇÃO DE ESPOROS EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE AERAÇÃO



A tomada de amostras foi realizada conforme protocolo descrito nas seções 4.15.2 e 4.15.1, para cinética de produção de esporos e para determinação de peso seco.

4.12 PRODUÇÃO DE ESPOROS EM DIFERENTES REGIMES DE AGITAÇÃO

O preparo dos erlenmeyers foi feito conforme descrito na seção 4.9, utilizando 10 g de arroz branco tipo agulhinha - não parbolizado e 7,5 mL de água destilada. Na sequência estes erlenmeyers foram fechados com tampão de algodão e gaze e autoclavados por 15 minutos a 121 °C.

O preparo do inóculo foi feito de acordo com o protocolo descrito na seção 4.5 de Material e Métodos. Cada frasco foi inoculado com 0,5 mL de uma suspensão de 10^7 esporos mL⁻¹ de *C. rosea*. A contagem dos esporos da suspensão foi feita em Câmara de Neubauer. A seguir, os frascos foram colocados sob fonte de luz, a 24 °C e iluminação de lâmpadas fluorescentes, tipo “luz do dia” de 20 W.

Para avaliar o efeito da agitação sobre a produção de esporos foram testados 5 diferentes regimes de agitação:

- erlenmeyers não agitados durante os 60 dias de fermentação (padrão utilizado nos experimentos anteriores);
- erlenmeyers agitados a cada 15 dias;
- erlenmeyers agitados a cada 7 dias;
- erlenmeyers agitados a cada 3 dias;
- erlenmeyers agitados todos os dias.

O processo de agitação foi manual, com duração de 1 min. por erlenmeyer. A tomada de amostras foi realizada conforme protocolo descrito na nas seções 4.15.2 e 4.15.1, para cinética de produção de esporos e para determinação de peso seco.

4.13 PRODUÇÃO DE ESPOROS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE INÓCULO

O preparo dos erlenmeyers foi feito conforme descrito na seção 4.9, utilizando 10 g de arroz branco tipo agulhinha - não parbolizado e 7,5 mL de água destilada. Na sequência estes erlenmeyers foram fechados com tampão de algodão e gaze e autoclavados por 15 minutos a 121 °C.

O preparo do inóculo foi feito de acordo com o protocolo descrito na seção 4.5 de Material e Métodos, no entanto, neste experimento foram preparados inóculos com diferentes concentrações de esporos:

- suspensão de esporos feita a partir de 2 placas de Petri em 15 mL de água destilada esterilizada;
- suspensão de esporos feita a partir de 1 placa de Petri em 20 mL de água destilada esterilizada;
- suspensão de esporos feita a partir de 1 placa de Petri em 40 mL de água destilada esterilizada (padrão utilizado nos experimentos anteriores);
- suspensão de esporos feita a partir de 1 placa de Petri em 400 mL de água destilada esterilizada;
- suspensão de esporos feita a partir de 1 placa de Petri em 4.000 mL de água destilada esterilizada.

Cada frasco foi inoculado com 0,5 mL de uma das suspensões de esporos. A contagem dos esporos das suspensões foi feita em Câmara de Neubauer. A seguir, os frascos foram colocados sob fonte de luz, a 24 °C e iluminação de lâmpadas fluorescentes, tipo “luz do dia” de 20 W.

A tomada de amostras foi realizada conforme protocolo descrito nas seções 4.15.2 e 4.15.1, para cinética de produção de esporos e para determinação de peso seco.

4.14 PRODUÇÃO DE ESPOROS EM SACOS PLÁSTICOS

Foi realizado um teste piloto de produção de esporos de *C. rosea* em saco plástico especial para alimento (“Multi – freezer para congelamento & microondas para aquecimento” / 25 cm x 20,5 cm). Foram testados dois sistemas: (1) sistema utilizando grãos de trigo como substrato, visto que este é o substrato mais relatado na literatura para produção de *C. rosea* (Tab. 2), contendo 50 g de substrato e 50 mL água destilada e (2) sistema utilizando 50 g de arroz branco tipo agulhinha - não parbolizado

e 37,5 mL de água destilada. Na sequência estes sacos foram fechados com tampão de algodão e gaze e autoclavados por 15 minutos a 121 °C.

O preparo do inóculo foi feito de acordo com o protocolo descrito na seção 4.5 de Material e Métodos, sendo que cada saco foi inoculado com 2,5 mL de uma suspensão de 10^7 esporos mL^{-1} de *C. rosea*. A contagem dos esporos das suspensões foi feita em Câmara de Neubauer. A seguir, os sacos foram colocados sob fonte de luz, a 24 °C e iluminação de lâmpadas fluorescentes, tipo “luz do dia” de 20 W.

A tomada de amostras foi realizada conforme protocolo descrito nas seções 4.15.2 e 4.15.1, para cinética de produção de esporos e para determinação de peso seco.

4.15 AMOSTRAGEM

Na maioria dos experimentos três erlenmeyers foram coletados para avaliar cada conjunto de condições a cada 15 dias durante os 60 dias de fermentação (0, 15, 30, 45 e 60 dias). Em alguns experimentos a amostragem foi feita em dias diferentes, nestes casos a informação será dada durante a descrição do experimento. No experimento feito em sacos plásticos foram coletados dois sacos plásticos para cada amostragem. Os resultados são, portanto, apresentados como média das duplicatas ou triplicatas \pm erro padrão.

4.15.1 Amostragem para Determinação de Peso Seco

Retirou-se uma amostra de 5,0 g do erlenmeyer com auxílio de espátula não esterilizada, após mistura prévia do substrato. Essa amostra foi submetida a secagem em estufa até peso constante a 55 °C para determinação do peso seco.

4.15.2 Amostragem para Avaliação da Cinética de Produção de Esporos – Substrato: Grãos

Retirou-se uma amostra de 1,0 g do erlenmeyer para contagem de esporos. Esta amostra foi retirada com auxílio de uma espátula não esterilizada, após mistura prévia do substrato. Cada amostra desta foi transferida para um béquer com 50 ml de solução aquosa de Tween 20 a 0,01% esterilizado, e mantida em agitador magnético durante 30 minutos. Quando necessário a suspensão foi diluída 10 vezes em Tween 20 a 0,01% e agitada em Vortex (agitador magnético) durante 30 segundos antes da contagem. Em seguida, procedeu-se a contagem dos esporos utilizando Câmara de Neubauer (dados no APÊNDICE 2).

4.15.3 Amostragem para Avaliação da Cinética de Produção de Esporos – Substrato: BDA

Quatro discos de micélio, em meio BDA, de 0,5 cm de diâmetro, foram retirados de uma placa de Petri e colocados em um tubo de ensaio contendo 5 mL de solução aquosa de Tween 20 a 0,01% esterilizado, e mantido em agitador magnético durante 30 minutos. Quando necessário a suspensão foi diluída 10 vezes em Tween 20 a 0,01% e agitada em Vortex durante 30 segundos antes da contagem. Em seguida, procedeu-se a contagem dos esporos utilizando Câmara de Neubauer (dados no APÊNDICE 2).

4.16 CONTAGEM DE ESPOROS – CÂMARA DE NEUBAUER

A contagem de esporos foi realizada com auxílio de uma Câmara de Neubauer – *Improved Chamber*, sendo que o procedimento utilizado encontra-se descrito no Apêndice 1 e os dados para cada figura descritos no Apêndice 2.

4.17 PRODUÇÃO DO PIGMENTO EM FERMENTAÇÃO LÍQUIDA

4.17.1 Preparo do Inóculo de *C. rosea*

O preparo do inóculo foi feito de acordo com o protocolo descrito na seção 4.5 de Material e Métodos, no entanto, neste experimento a suspensão de esporos foi feita a partir de 2 placas de Petri em 40 mL de água destilada esterilizada ($6,75 \times 10^7$ esporos/mL).

4.17.2 Preparo do Meio Líquido de Batata Dextrose

O meio de cultivo líquido foi preparado através da extração dos nutrientes de batatas compradas no mercado local. As batatas foram lavadas, descascadas e raladas em ralador. Aproximadamente 120 g de batata ralada foram colocadas em água destilada e aquecidas a 100 °C para extração durante 30 minutos. Ao extrato obtido foi adicionado 12 g de glucose anidra e o volume foi completado para 600 mL.

A seguir, esse meio foi transferido para 6 erlenmeyers de 500 mL (100 mL em cada frasco) e procedeu-se a autoclavagem (15 minutos a 121 °C). Após o resfriamento foi adicionada uma alíquota de 5 mL da suspensão de esporos (inóculo)

Os erlenmeyers foram incubados durante 15 dias em três condições:

- 2 erlenmeyers no escuro e temperatura de 21 °C
- 2 erlenmeyers em fotoperíodo de 12 h luz e temperatura de 20 °C
- 2 erlenmeyers em fotoperíodo de 24 h luz e temperatura de 24 °C

4.18 EXTRAÇÃO DO PIGMENTO

Após o período de incubação, os meios de cultivo foram separados do micélio por filtração à vácuo. A biomassa resultante dos 2 erlenmeyers de cada tratamento foi colocada em uma Estufa de Esterilização e Secagem (Nova Ética, série 400D), a 55 °C para secagem e posteriormente foi pesada.

A seguir, a biomassa obtida para cada tratamento foi submetida a uma extração com solvente orgânico (clorofórmio:metanol 2:1, v/v), sob agitação com agitador magnético à temperatura ambiente durante 48 horas. Em seguida, os materiais foram centrifugados (Centrífuga GS-15 Beckman / 8.000 rpm por 7 min) e os sobrenadantes denominados de Cr0 (referente ao tratamento mantido no escuro), Cr12 (referente ao tratamento mantido sob 12 h de luz) e Cr24 (referente ao tratamento mantido sob 24 h de luz).

4.19 PURIFICAÇÃO DO PIGMENTO

As amostras foram particionadas utilizando funil de separação. Cada amostra foi adicionada no funil juntamente com água, metanol e clorofórmio. Essa mistura foi deixada em repouso até ocorrer a separação em duas fases, sendo a fase aquosa descartada. Esse processo foi repetido 3 vezes para cada amostra.

A fase orgânica das amostras foi reduzida em rotaevaporador, e cada fração aplicada em placa de sílica gel, CCD (Cromatografia de Camada Delgada) preparativa tendo como fase móvel a mistura de solventes etanol:água:hidróxido de amônio (80:20:1). As CCD obtidas foram expostas a radiação ultra-violeta (UV) para a identificação e marcação das bandas que emitiram fluorescência. Além disso, estas bandas eram visíveis a olho nu devido a sua coloração, o que facilitou a recuperação delas. Essa separação foi feita através da raspagem de cada uma das bandas da CCD com auxílio de uma espátula.

Para cada amostra foram obtidas 3 bandas: uma banda de coloração alaranjada que praticamente permaneceu na origem denominada de **banda 0**; uma banda intermediária alaranjada clara, geralmente visível somente com auxílio de UV denominada de **banda 1**; e uma banda superior de coloração amarela que compreende a mistura de duas bandas (visível em UV) denominada de **banda 2/3**. A separação da banda 2/3 foi feita posteriormente por processo de extração com solventes distintos.

Cada banda foi colocada em um erlenmeyer (125 mL) juntamente com 25 mL de clorofórmio mantido sob agitação com agitador magnético à temperatura ambiente

durante 24 horas. Através da extração com clorofórmio foi possível obter a banda 0, a banda 1 e a banda 2, sendo que o pigmento correspondente a banda 3 ficou aderido à sílica.

Após isto, estas frações foram centrifugadas (8.000 rpm, 7 min) para retirada da sílica e concentradas em rotaevaporador. A sílica da banda 2/3 foi novamente colocada num erlenmeyer (125 mL) com 25 mL de metanol, mantido sob agitação com agitador magnético à temperatura ambiente durante 24 horas, para extração da **banda 3**. Esta fração foi então centrifugada e concentrada.

Esse procedimento foi repetido para as 3 CCD preparativas, correspondente às 3 amostras (Cr0, Cr12 e Cr24). Com isso foram obtidas as seguintes frações (tratamento/banda):

Cr0/0	Cr12/0	Cr24/0
Cr0/1	Cr12/1	Cr24/1
Cr0/2	Cr12/2	Cr24/2
Cr0/3	Cr12/3	Cr24/3

Dentre as amostras obtidas, procedeu-se a identificação da Cr12/0. Para isso, a amostra foi novamente concentrada em rotaevaporador e liofilizada.

4.20 IDENTIFICAÇÃO DO PIGMENTO

4.20.1 Análise por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13 (RMN-¹³C)

Os experimentos de RMN foram realizados em um espectrômetro Bruker Avance DRX 400 MHz. A amostra purificada foi solubilizada em CDCl₃ e seus deslocamentos químicos medidos em ppm a 30°C. Os espectros de RMN foram feitos em tubos de quartzo de 20 cm de comprimento e 5 mm de diâmetro interno, e TMS ($\delta = 0$) como padrão interno.

RMN de ^{13}C : a maior parte dos espectros foi realizada com o carbono desacoplado e obtidos em 100.625 MHz com relação ao núcleo de ^{13}C .

RMN de ^{13}C DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer): os experimentos de DEPT foram usados para assinalar sinais dos carbonos primários e CH, positivos, e os CH_2 , negativos, facilitando deste modo a determinação dos sinais correspondentes aos carbonos primários, secundários, terciários e quaternários, auxiliando os assinalamentos do componente lipídico.

4.20.2 Análise por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (CG-EM)

A composição dos ácidos graxos presentes na amostra foi realizada através de metanólise (5 mg de amostra) sob refluxo de uma solução contendo 5% H_2SO_4 em MeOH por 2 h. Os ácidos graxos metil ésteres (AGME) resultantes foram extraídos através de uma partição entre MeOH e Hexano. A fase hexânica foi lavada com água e analisada por CG-EM comparando-se seus respectivos valores de R_f e seus perfis de IE-EM com padrões de AGME (Sigma Co.), utilizando uma coluna capilar (DB-225 30 m x 0.25 mm d.i.) e He como gás de arraste, com fluxo de $2\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, apresentando a seguinte programação da rampa de temperatura: a) 50°C (1 min); b) $50\text{-}210^\circ\text{C}$ ($40^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) mantida por 9 min; c) $210\text{-}230^\circ\text{C}$ ($40^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) mantida constante até o final de cada análise por 20 min.

4.21 FOTOGRAFIAS

Durante o crescimento micelial de *C. rosea* nas diferentes condições de cultivo, ocorreram mudanças na coloração do meio de cultivo e do próprio micélio. Estas mudanças de coloração foram registradas por meio de fotografias utilizando uma máquina digital D-150 Zoom OLYMPUS brio zoom.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos são apresentados em sete seções. A primeira trata dos estudos preliminares para determinar a cinética de crescimento micelial, considerando a influência da temperatura e do fotoperíodo. Na segunda seção são relatados os experimentos necessários para o desenvolvimento de um protocolo para avaliação da produção de esporos. A terceira seção trata da caracterização da cinética de produção de esporos sobre grãos de trigo, utilizado como substrato padrão para produção de esporos de *C. rosea*. Na seção seguinte são testados substratos diferentes, visando selecionar um meio de cultivo. Na quinta seção são apresentados diferentes experimentos que visam otimizar as condições de cultivo no substrato selecionado. O resultado de um teste piloto utilizando sacos plásticos para o cultivo do fungo encontra-se na sexta seção. Na última seção são relatados os experimentos realizados para produção e caracterização do pigmento produzido por *C. rosea*.

5.1 ESTUDOS PRELIMINARES DE CULTIVO DE *Clonostachys rosea* PARA DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO MICELIAL

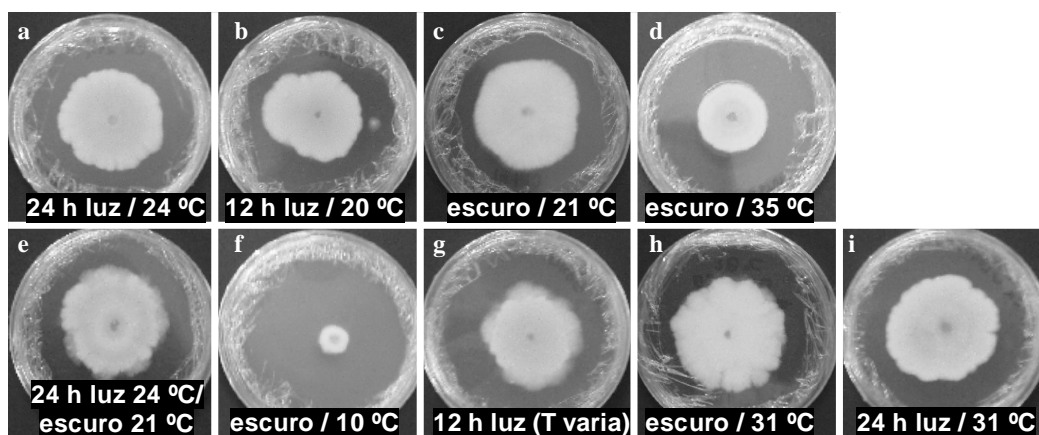
De acordo com a literatura, a produção de *C. rosea* tem sido feita utilizando diferentes condições de temperatura (variando de 18 a 30 °C) e de fotoperíodo (12 h de luz, 14 h de luz ou 24 h de luz por dia), conforme relatado na Tabela 2. No entanto, não existem explicações para tamanha variação de condições, o que justifica a realização de um experimento para verificar qual a influência da temperatura e do fotoperíodo sobre o crescimento micelial e a produção de esporos de *C. rosea*.

Neste experimento, foram realizadas duas formas de avaliação concomitantemente: uma avaliação visual qualitativa e uma avaliação do crescimento das colônias, realizada através da medição da área com uso de um Planímetro. Normalmente a avaliação é feita através da medição do diâmetro, mas nesse caso este método não foi escolhido porque as colônias apresentaram um crescimento irregular, o que dificultaria a escolha de qual diâmetro medir. Ao mesmo tempo foi feita análise

visual qualitativa do desenvolvimento da biomassa, da produção de pigmento e de esporos nas diferentes condições. Isso permitiu constatar que o fungo se desenvolveu em 9 diferentes condições de temperatura e luminosidade mas com aspectos distintos no que diz respeito à velocidade, coloração e características do micélio, o que será descrito detalhadamente a seguir.

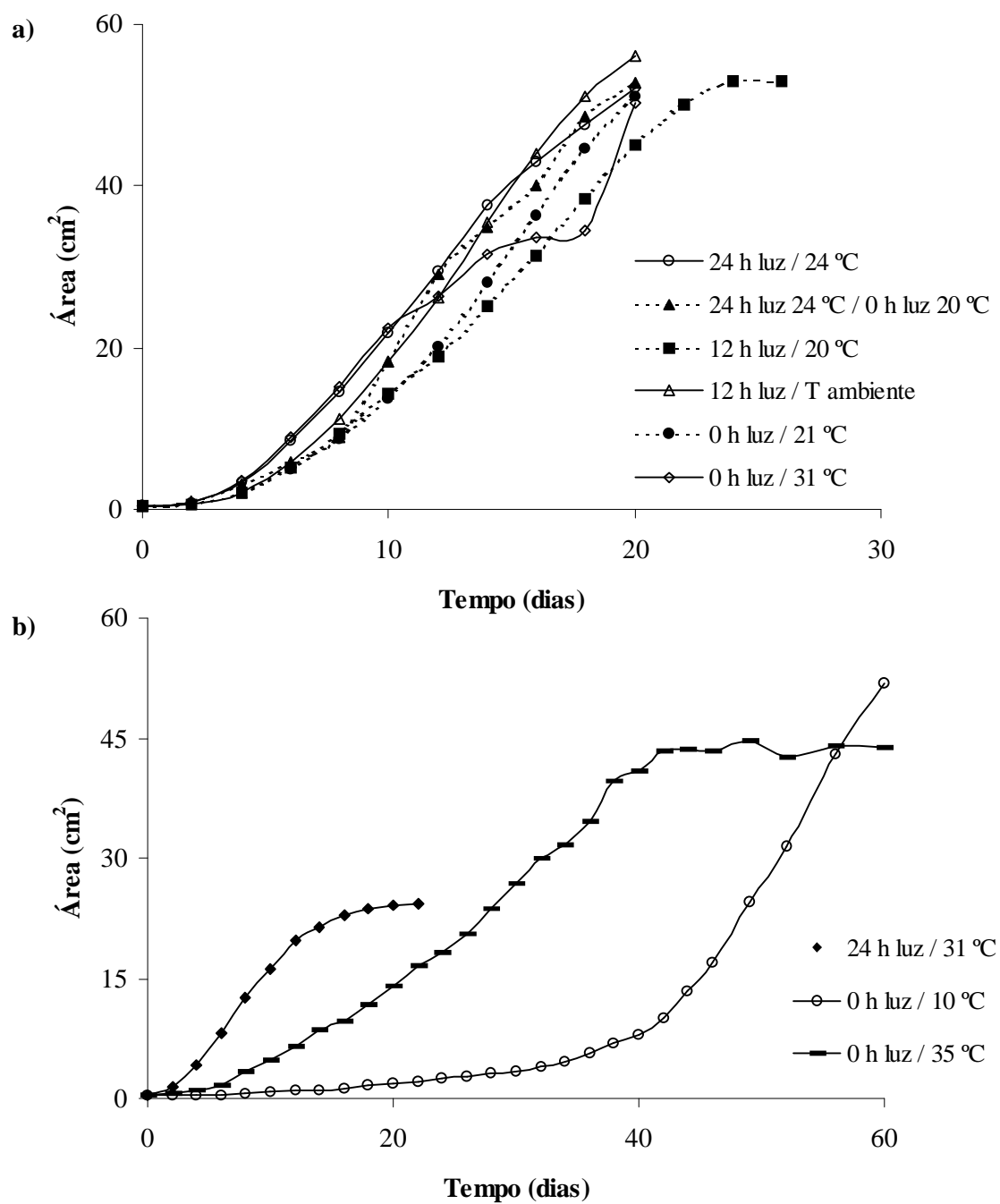
Nas placas sob 24 h luz e 24 °C houve grande expansão do fungo, sendo o primeiro tratamento a cobrir totalmente a área da placa, em um período de 21 dias, e também o primeiro a iniciar a esporulação (após 21 dias). No entanto, a altura do micélio foi baixa, com pouco desenvolvimento de hifas aéreas. O micélio formado apresentou cor rosa salmão, característica deste fungo, cor que também pode ser vista na parte inferior das placas (Fig. 10a e 11a).

FIGURA 10 - DESENVOLVIMENTO DE *C. rosea* EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE TEMPERATURA E FOTOPERÍODO (10 DIAS APÓS INOCULAÇÃO)



As placas que foram mantidas sob um fotoperíodo de 12 h de luz e 20 °C também apresentaram grande expansão do micélio. Neste caso notou-se um maior desenvolvimento de hifas aéreas do que na condição anterior. A coloração do micélio foi mais clara do que aquela anteriormente descrita e, na parte inferior das placas, predominou a cor alaranjada (Fig. 10b). O micélio cobriu totalmente a placa após 26 dias de cultivo (Fig. 10a).

FIGURA 11 - CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE *C. rosea* EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE TEMPERATURA E FOTOPERÍODO



Já nas placas crescidas na ausência de luz, notou-se o desenvolvimento de muitas hifas aéreas, formando colônias com micélio mais alto e totalmente branco, dando um aspecto cotonoso. Houve diferença na parte inferior das placas, sendo que a coloração predominante das hifas foi branca nas placas que estavam a 31 °C (Fig. 10h) e amarela naquelas que estavam a 21 °C (Fig. 10c). Quanto à velocidade de crescimento, como pode ser observado na Figura 11a, o fungo mantido a 21 °C comportou-se de forma semelhante àqueles que se desenvolveram em condições de 24 h luz e em temperaturas próximas, como 20 °C e 24 °C. No entanto, estas placas foram as últimas a iniciarem a produção de esporos.

Em condições de temperaturas mais elevadas como, por exemplo, 35 °C e ausência de luz (Fig. 10d), o fungo se desenvolveu mais lentamente e apresentou um micélio ralo, compacto, de coloração bege, com algumas circunferências concêntricas de coloração marrom. Mesmo após 2 meses de experimento, o fungo mantido sob estas condições não conseguiu se expandir por toda a placa, ele apresentou um crescimento até o 40º dia e após este período não expandiu mais. Já em 31 °C nota-se que o crescimento do fungo foi rápido no início (Fig. 11a e 11b), da mesma forma que nos tratamentos em 24 h luz e 24 °C, 12 h luz e 20 °C, entre outros, mas após 14 dias a velocidade diminuiu consideravelmente e a área da colônia atingiu um platô. No tratamento 24 h luz e 31 °C o fungo conseguiu cobrir metade da área total da placa (Fig. 11b), já no tratamento na ausência de luz e 31 °C o fungo conseguiu cobrir uma área maior mas depois parou de expandir (Fig. 11a). É interessante observar que no escuro e 35 °C o fungo conseguiu produzir uma colônia com área maior antes de parar seu crescimento do que a colônia de 24 h luz e 31 °C, embora tenha levado mais tempo para iniciar o desenvolvimento (Fig. 11b). Este fato pode ter ocorrido devido a secagem do meio porque dentro da estufa de 35 °C foi mantido um béquer com água durante todo o experimento, para manter a umidade no local, enquanto que na caixa de papelão onde foi feito o experimento em 31 °C nada foi colocado.

O desenvolvimento mais lento do fungo ocorreu na condição de 10 °C e ausência de luz (Fig. 10f), o que pode estar relacionado com a diminuição na eficácia do biocontrole quando as temperaturas foram menores que 15 °C, como foi notado por

SUTTON et al. (1997). Além disso, neste tratamento inicialmente houve a predominância de hifas aéreas concentradas sobre o disco de micélio. Durante os primeiros 40 dias de cultivo o crescimento foi lento, como se fosse uma fase adaptativa, após este período o fungo apresentou um crescimento rápido com velocidade semelhante àquela dos tratamentos mais favoráveis, cobrindo toda a área da placa em 20 dias (Fig. 11b).

O tratamento observado na Figura 10e constituiu-se de uma alternância de condições: 4 dias em 24 h luz e 24 °C e 4 dias na ausência de luz a 21 °C. Notou-se aqui a formação de bandas de cores alternadas entre rosa salmão, cor característica da primeira condição, e amarela, coloração característica do segundo tratamento. O micélio também apresentou características intermediárias, com um aspecto cotonoso mas, ao mesmo tempo, com a presença de algumas hifas aéreas. O desenvolvimento da colônia foi semelhante ao encontrado nas duas condições.

Na Figura 10g pode-se observar o fungo que foi colocado num regime de 12 h luz na bancada do laboratório, sujeito a variação de temperatura (experimento realizado entre outubro e novembro). Seu desenvolvimento foi semelhante àquele dos tratamentos de 12 h luz e 20 °C e 24 h luz e 24 °C (Fig. 11a).

Nota-se que o comportamento do fungo *C. rosea* no que diz respeito à velocidade de aumento na área da colônia foi muito semelhante em 6 das 9 condições de temperatura e fotoperíodo testadas. Nestas 6 condições o fungo apresentou um rápido desenvolvimento da colônia, cobrindo a placa em aproximadamente 20 dias.

Considerando as observações qualitativas realizadas, supõe-se que as variações na coloração das colônias devem ocorrer devido à temperatura ou ao fotoperíodo ou ainda, a uma interação entre ambos. Entretanto, ao comparar as placas incubadas dentro de uma caixa de papelão em uma sala climatizada, apresentando assim a mesma temperatura (31 °C), mas em condições distintas de fotoperíodo (24 h de luz e escuro) (Fig. 10h e 10i), notou-se que houve mudança na coloração. Assim, conclui-se que a variação observada na coloração ocorreu devido ao fotoperíodo, visto que a temperatura foi a mesma.

De acordo com SUTTON et al. (1997), as colônias do fungo *C. rosea* em ágar são geralmente esbranquiçadas, alaranjadas ou salmão. Entretanto, não foi encontrado nenhum trabalho que discuta as condições que levam o fungo a apresentar esta variação de coloração, sua função ou o que seria responsável por ela, como um pigmento de proteção ou um composto com outra função que por acaso é pigmentado. De maneira geral, sabe-se que a luz influencia os fungos de muitas maneiras, podendo afetar o metabolismo, crescimento, desenvolvimento sexual e assexual, formação de pigmentos e tropismo, entre outros (SÁNCHEZ-MURILLO et al., 2004).

A influência da luz foi comprovada através deste experimento visto que *C. rosea* apresentou comportamentos distintos quanto a sua coloração e velocidade de crescimento em condições diferentes de luminosidade. Esse fato levou a inclusão de um novo objetivo no trabalho visando a caracterização do “pigmento” formado em três das diferentes condições avaliadas, que é apresentado na seção 5.7.

Outro ponto importante a ser considerado é a formação de esporos induzida pela luz (reprodução assexuada), uma vez que o objetivo principal desta pesquisa é a otimização da produção de esporos de *C. rosea*. Segundo COCHRANE (1997) e INGLIS et al. (1999) (citados por ONOFRE et al., 2001, p. 615)⁹ a luz visível possui um efeito estimulante na reprodução dos fungos, não somente desencadeando a maturação dos primórdios reprodutivos, mas também aumentando o número das estruturas em valores absolutos. Alguns fungos podem iniciar o processo de esporulação na ausência de luz, entretanto, este fator torna-se importante na fase final do processo. Nas observações qualitativas feitas no decorrer deste experimento, notou-se que a primeira colônia de *C. rosea* a iniciar a esporulação foi a de 24 h luz e 24 °C, 21 dias após a incubação. Nos outros tratamentos também foi observada a produção de esporos mas o processo de esporulação demorou mais tempo para iniciar, sendo mais lento nas colônias mantidas no escuro (Tab. 4).

⁹ COCHRANE, V.W. **Physiology of fungi**. New York: John Wiley, 1997. 958p. INGLIS, G.D.; DUKE, G.M.; KAWCHUK, L.M.; GOETTEL, M.S. Influence of oscillating temperatures on the competitive infection and colonization of the migratory grasshopper by *Beauveria bassiana* and *Metarhizium flavoviride*. **Biological Control**, v.14, p.111-120, 1999.

TABELA 4 - OBSERVAÇÃO DO INÍCIO DA ESPORULAÇÃO NAS COLÔNIAS INCUBADAS EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE TEMPERATURA E LUMINOSIDADE

Condição de incubação	Início da esporulação (dias após incubação das placas)
24 h luz e 24 °C (sala climatizada)	21 dias
12 h luz e 20 °C (sala climatizada)	25 dias
12 h luz e T ambiente (bancada do laboratório)	25 dias
0 h luz e 31 °C (caixa de papelão em sala climatizada)	27 dias
0 h luz e 35 °C (estufa)	29 dias

Baseado nisto, foi escolhida a condição de 24 h luz e 24 °C para experimentos futuros, visto que neste tratamento o fungo apresentou um crescimento micelial e esporulação mais rápidos.

5.2 PROTOCOLO PARA AVALIAÇÃO DOS EXPERIMENTOS DE PRODUÇÃO DE ESPOROS

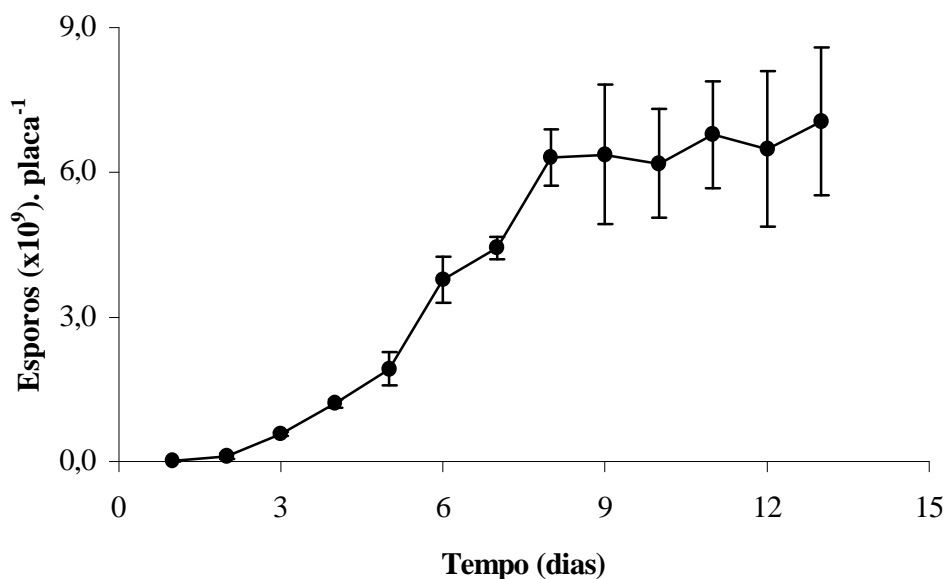
O objetivo geral deste projeto é otimizar a produção de esporos de *C. rosea*, no entanto, na literatura foram encontrados trabalhos com metodologias muito diversas para a produção de esporos, visto que a finalidade da maioria dos autores era apenas obter material suficiente para realizar testes de campo. Além disso, esses trabalhos não apresentam explicações claras sobre os métodos utilizados para a produção de esporos e para a avaliação desta produção. Assim, foi preciso fazer um estudo inicial para otimizar estes métodos básicos. Esse estudo foi subdividido em três etapas: (1) produção de esporos em placas de Petri para inóculo; (2) cinética de liberação de esporos e (3) influência das formas de obtenção da amostra em erlenmeyers.

5.2.1 Produção de Esporos em Placas de Petri para Inóculo

O preparo de placas para serem utilizadas posteriormente como inóculo é pouco relatado na literatura e não apresenta uma metodologia padrão. Além disso, a cinética de produção de esporos em placas de Petri não é conhecida. Foi necessário realizar um experimento para elucidar essa cinética de produção e para identificar o tempo ótimo de incubação destas placas em termos de quantidade de esporos produzida, feito de acordo com o método descrito na seção 4.4.

Conforme pode ser observado na Figura 12, a produção de esporos em placas de Petri atingiu seu máximo e estabilizou a partir do 8º dia.

FIGURA 12 - CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE ESPOROS EM PLACAS DE PETRI



Na maioria dos trabalhos a produção de esporos para inóculo foi feita em placas de Petri contendo BDA, incubadas em diferentes condições de temperatura e fotoperíodo. Depois de um certo período de tempo, geralmente não mencionado, as placas foram submetidas a uma raspagem leve para retirada dos esporos com água destilada esterilizada, misturada ou não com algum tipo de surfactante, como Tween

ou Triton (VALDEBENITO-SANHUEZA et al., 1997), (YU; SUTTON, 1997), (DALL'ONDER, 1997), (SUTTON et al., 2002) (KRAUSS; SOBERANIS, 2002).

DALL'ONDER (1997) apresentou um relato um pouco mais elaborado em sua tese, na qual os esporos foram produzidos em meio BDA, incubado a 24 °C e 24 h luz, durante 8 dias. Neste caso, a produção de esporos não envolveu o crescimento da colônia e posterior esporulação, pois foi feita uma suspensão de esporos para inocular as placas, estimulando assim uma maior e mais rápida produção de esporos, denominada de técnica de “*overculture*”. No entanto, o autor não explicou nem apresentou resultados que justificassem o período de incubação das placas durante 8 dias para utilização como inóculo.

Estes resultados concordaram com aqueles obtidos por DALL'ONDER (1997). Assim, foi adotado como protocolo para a preparação de inóculo o uso de placas com 8 dias de idade (período de incubação).

5.2.2 Cinética de Liberação de Esporos de Substratos Sólidos

A contagem de esporos é o principal método utilizado para avaliar os experimentos. No entanto, antes disso é necessário encontrar uma maneira de retirar os esporos que ficam aderidos aos substratos sólidos utilizados no processo de fermentação. Na literatura foram encontradas diversas metodologias para realizar a extração dos esporos:

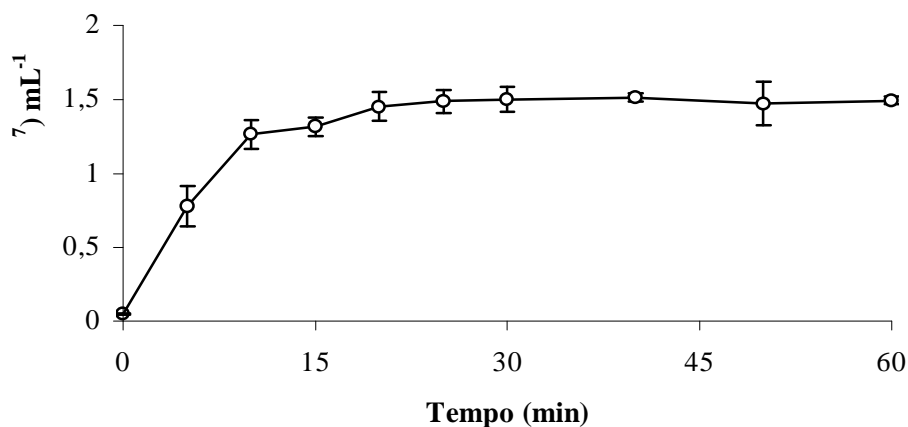
- suspensões foram preparadas pela agitação de 30 g de grãos colonizados pelo fungo em 1 L de água destilada mais surfactante (0,5 mL Triton X-100 L⁻¹ de água) por 15 min (SUTTON et al., 2002);
- meio de cultivo foi triturado juntamente com 100 mL de água esterilizada, filtrado, e lavado com mais 100 mL de água (JENSEN; KNUDSEM; JENSEN, 2002);
- 1 g de arroz colonizado foi extraído em água destilada esterilizada (24 mL com 1% Tween 80) (KRAUSS; SOBERANIS, 2002);

- suspensões foram preparadas pela adição de água com 0,01% Tween 80 às culturas, que foram agitadas e filtradas (KÖHL et al., 1995);
- suspensões de esporos foram obtidas pela agitação dos grãos de trigo colonizados em água destilada com 0,01% de Tween 80 (VALDEBENITO-SANHUEZA et al., 1997);
- 1 g de trigo colonizado foi colocado em um erlenmeyer com 50 mL de solução aquosa de Tween 20 a 0,01% estéril e mantido em agitador magnético durante 15 minutos (DALL'ONDER, 1997).

Novamente, foi adotada a metodologia utilizada por DALL'ONDER (1997) por apresentar a melhor descrição do procedimento. No entanto, não há nenhum experimento que demonstre como o autor chegou a este valor. Além disso, os substratos utilizados pelos vários autores são diferentes e na maioria dos trabalhos o tempo de agitação necessário para liberação dos esporos dos substratos não é mencionado. Baseado nesta falta de informações, foi necessário determinar qual o tempo de agitação suficiente para liberar os esporos dos grãos de trigo e arroz (substratos inicialmente testados) para realizar a contagem.

A Figura 13 mostra que durante os primeiros 10 minutos ocorreu uma grande liberação de esporos. Depois disto, a concentração de esporos liberados aumentou lentamente até aproximadamente 20 minutos. O tempo de agitação de 30 minutos foi escolhido porque, neste caso, não ocorre mais um aumento na liberação de esporos. Além disso, ele permite uma margem de erro, capaz de garantir que, no caso de amostras com diferentes concentrações de esporos, a extração seja capaz de extrair os esporos. Resultados semelhantes foram obtidos quando o mesmo tipo de experimento foi feito utilizando trigo como substrato (dados não mostrados).

FIGURA 13 - CINÉTICA DE LIBERAÇÃO DE ESPOROS UTILIZANDO ARROZ COMO SUBSTRATO



Isto mostra que o tempo de agitação de 15 min utilizado por DALL'ONDER (1997) e SUTTON et al. (2002) não é suficiente para a liberação máxima de esporos, levando a aproximadamente 90% de liberação. Além disso, mesmo após uma hora de agitação, muitos grãos ainda apresentavam esporos aderidos (visualmente comprovado pela presença de grumos pequenos de coloração rosa salmão aderidos aos grãos). No entanto, um tempo maior de agitação dificultaria a avaliação dos experimentos por ser mais moroso, não proporcionar uma liberação de esporos significativamente maior e, além disso, proporcionar a degradação do substrato que aumenta a quantidade de partículas na solução e dificulta a contagem dos esporos. Com base nestas considerações e no resultado obtido, o tempo escolhido foi de 30 minutos, para ser adotado como protocolo para os próximos experimentos.

5.2.3 Influência das Formas de Obtenção da Amostra na Produção de *C. rosea* sobre Grãos de Arroz em Erlenmeyers

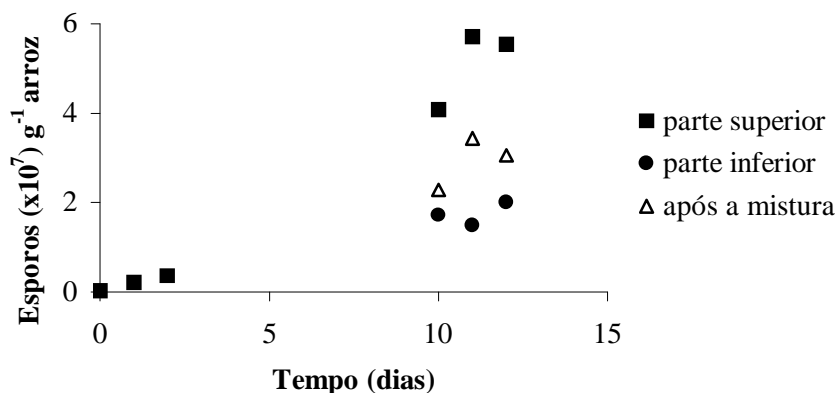
De acordo com a metodologia escolhida para avaliação dos experimentos, utilizada por DALL'ONDER (1997), a amostragem para verificar a produção de esporos foi feita através da retirada de aproximadamente 1 g de substrato do recipiente

de fermentação. DALL'ONDER (1997) utilizou frascos de vidro translúcido (1 L) que foram mantidos na posição horizontal durante a fermentação, no entanto, ele não descreveu como realizou a amostragem, isto é, se retirou amostras da parte superior ou da parte interior, ou se realizou uma mistura do substrato antes de retirar a amostra. Conforme consta em sua tese, embora não de forma explícita, provavelmente as amostras foram retiradas de forma subsequente do mesmo frasco ao longo do tempo e, considerando o formato da garrafa utilizada e o comportamento do fungo *C. rosea*, cujo micélio se entrelaça no substrato, tornando-o muito compacto, supõe-se também ser difícil realizar uma mistura sem causar dano significativo ao fungo (que poderia afetar a produção de esporos) ou retirar a amostra do interior destes recipientes. Sendo assim, o autor provavelmente realizou apenas uma raspagem dos grãos superficiais para obter a amostra.

Na literatura não foi encontrado nenhum outro trabalho onde a forma de retirada de amostras para avaliação da produção de esporos de *C. rosea* foi descrita. Portanto, foi necessário verificar se a maneira de obtenção desta amostra influenciaria a quantidade de esporos obtida. Assim, se a produção de esporos fosse uniforme, a amostra poderia ser retirada de qualquer lugar do recipiente sem uma mistura prévia.

Esta avaliação foi feita em erlenmeyers (500 mL) com 100 g de arroz branco considerando três locais de retirada da amostra: (1) parte superior; (2) parte inferior e (3) após mistura do substrato (conforme esquema apresentado na Fig. 8, seção 4.7), sendo que nos dias 0, 1 e 2 após a inoculação não foram retiradas amostras nem da parte inferior nem da mistura, pois neste período inicial o fungo apresentou somente um crescimento na camada superficial de grãos (constatação visual). Já nos dias 10, 11 e 12 pôde-se proceder a amostragem nos três pontos (Fig. 14).

FIGURA 14 - INFLUÊNCIA DE DIFERENTES LOCAIS DE RETIRADA DE AMOSTRA NA PRODUÇÃO DE ESPOROS SOBRE ARROZ



De acordo com a Figura 14, nota-se que a maior produção de esporos foi obtida quando as amostras foram retiradas somente da superfície e que a menor produção ocorreu nas amostras da parte inferior do frasco. Isso indica que *C. rosea* teve um melhor desenvolvimento de biomassa em condições com maior disponibilidade de oxigênio, o que permitiu uma maior esporulação.

Ao contrário, no interior do substrato a quantidade de oxigênio disponível deve ter sido menor, ocasionando uma redução tanto no desenvolvimento micelial do fungo quanto na produção de esporos. Isso ocorreu em parte devido a compactação do substrato e ao entrelaçamento dele pelo micélio. Essa redução na quantidade de oxigênio disponível ocorre também devido ao problema da “difusão-reação”, pois ao mesmo tempo em que o oxigênio está difundindo através do caminho para o interior do leito de substrato, o fungo está consumindo o oxigênio e assim, o “ar” que chega por difusão no centro do leito tem uma concentração menor de oxigênio. As amostras retiradas após mistura do substrato apresentaram uma produção intermediária. Estes resultados demonstram que o local de retirada das amostras influenciou o resultado obtido.

Assim, não se pode retirar amostras somente da superfície e extrapolar para todo o frasco, pois isso causa uma superestimação da produção já que a concentração de esporos na superfície é maior do que no resto do leito. Portanto, se DALL’ONDER

(1997) realmente tirou amostras somente da superfície, então deve ter superestimado a produção. Ao contrário, é necessário definir um procedimento padrão que represente de forma mais fidedigna a quantidade média de esporos produzida no frasco como um todo. Neste trabalho optou-se por realizar uma mistura do substrato colonizado antes da retirada da amostra em todos os processos de avaliação.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DA CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *C. rosea* SOBRE GRÃOS DE TRIGO

Na literatura não existem estudos sobre a cinética de produção de esporos de *C. rosea*. A grande maioria dos autores apresenta somente o valor final de esporos que conseguiu obter em determinadas condições, apenas DALL'ONDER (1997) apresenta dados sobre a produção de esporos durante uma única fermentação, mas é apenas uma curva com poucos pontos.

Devido a esta falta de informações sobre a cinética de produção de esporos, foram feitos experimentos para caracterizá-la, utilizando trigo como substrato em frascos de Erlenmeyer. O trigo foi escolhido para iniciar os experimentos porque na literatura notou-se que a maioria dos autores utiliza esse substrato para a produção de esporos de *C. rosea*.

Quatro modelos cinéticos empíricos foram ajustados aos dados obtidos por regressão não linear com intuito de selecionar a melhor equação. Os modelos utilizados foram as equações linear, exponencial e logística, tipicamente utilizadas para caracterizar perfis de crescimento em FES, mas que também podem ser utilizados para a produção de esporos (SANGSURASAK; NOPHARATANA; MITCHELL, 1996). Além destes, foi utilizado o modelo de desaceleração, desenvolvido com a finalidade de descrever perfis com um período longo durante o qual o crescimento desacelera lentamente (IKASARI; MITCHELL, 2000).

A Tabela 5 mostra as formas integradas destes quatro modelos, onde:

K = taxa de produção de esporos linear (número de esporos (g^{-1} substrato \bullet dia))

k = coeficiente de decaimento de 1ª ordem do modelo de desaceleração (dia^{-1})

L = fração de pontas de hifas que sobrevive a entrada no modelo de desaceleração (adimensional)

t = tempo (dia)

t_a = tempo inicial do modelo de desaceleração (dia)

N = concentração de esporos (número de esporos g^{-1} substrato)

N_0 = concentração de esporos inicial (número de esporos g^{-1} substrato)

N_m = concentração máxima de esporos possível (número de esporos g^{-1} substrato)

N_A = concentração de esporos no tempo inicial do modelo de desaceleração (número de esporos g^{-1} substrato)

μ = parâmetro relacionado com a velocidade de produção de esporos (dia^{-1})

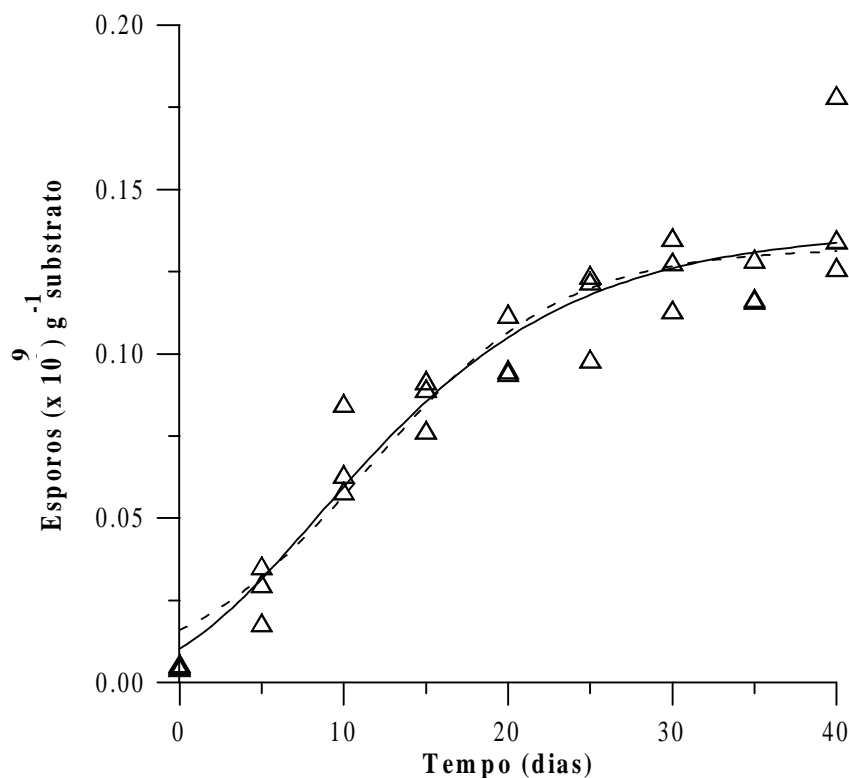
TABELA 5 - FORMA INTEGRAL DE EQUAÇÕES EMPÍRICAS DE CRESCIMENTO

Modelo	Equação integral	
Linear	$N = Kt + N_o$	(1)
Exponencial	$N = N_0 e^{\mu \cdot t}$	(2)
Logística	$N = \frac{N_m}{1 + \left(\frac{N_m}{N_0} - 1 \right) e^{-\mu t}}$	(3)
Desaceleração	$N = N_A \exp \left[\frac{\mu L}{k} (1 - e^{-k(t-t_a)}) \right] \quad t \geq t_a$	(4)

FONTE: VICCINI et al., 2001

A Figura 15 mostra os ajustes logístico e do modelo de desaceleração aos dados. O experimento teve a duração de 40 dias sendo que a cada 5 dias foi feita uma avaliação, onde foram sacrificados 3 erlenmeyers.

FIGURA 15 - PERFIL DE PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *C. rosea* SOBRE TRIGO, MOSTRANDO O AJUSTE DA EQUAÇÃO LOGÍSTICA (- - -) E DO MODELO DE DESACELERAÇÃO (—) AOS DADOS (Δ)



A Tabela 6 mostra o resultado da análise do perfil de produção de esporos de *C. rosea* sobre grãos de trigo utilizando os quatro modelos empíricos. A equação linear apresenta uma Soma dos Resíduos Quadrados (SRQ) baixa, no entanto, não se ajusta bem ao perfil. Isso mostra que para avaliar o ajuste de um modelo não se deve somente observar se a SRQ é baixa, mas também o gráfico resultante para verificar se a equação fornece um bom ajuste. A equação exponencial, apesar de apresentar a menor SRQ, não conseguiu descrever o perfil inteiro, ajustando-se bem somente aos pontos referentes aos primeiros 15 dias de fermentação.

TABELA 6 - ANÁLISE CINÉTICA DO PERFIL DE PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *C. rosea* UTILIZANDO QUATRO MODELOS EMPÍRICOS

Parâmetros determinados por regressão			
Linear	Exponencial	Logístico	Desaceleração
K (N-unid. dia ⁻¹) = 0,003	N ₀ = 0,018	N ₀ = 0,016	N _A = 0,010
		N _m = 0,132 x 10 ⁸	μL (dia ⁻¹) = 0,293
	μ (dia ⁻¹) = 0,110	μ (dia ⁻¹) = 0,171	k (dia ⁻¹) = 0,113
SRQ = 0,008	SRQ = 0,002	SRQ = 0,005	SRQ = 0,004
Intervalo (dia) = 0 – 40	Intervalo (dia) = 0 – 15	Intervalo (dia) = 0 – 40	Intervalo (dia) = 0 – 40

Unidades usadas para N₀, N_m e N_A = esporos (x 10⁸) g⁻¹ substrato

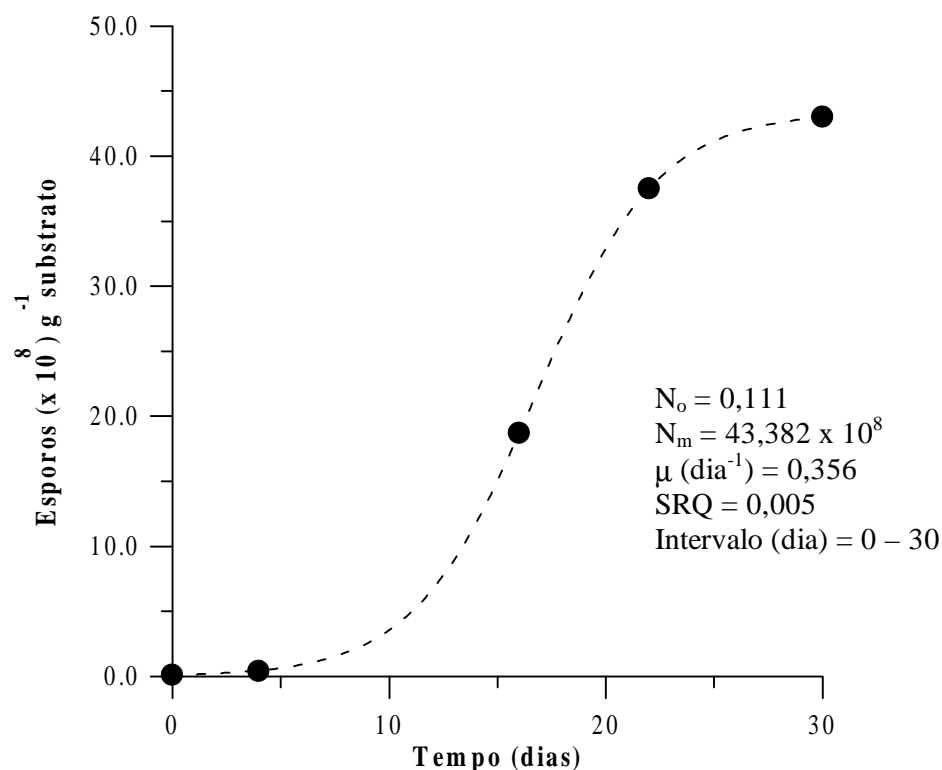
Os melhores ajustes foram obtidos pela equação logística e pelo modelo de desaceleração, no entanto, como pode ser observado na Fig. 15, a equação logística se ajusta bem aos dados nos estágios intermediário e final da fermentação, mas superestima um pouco o valor inicial. Este problema ocorre porque a equação logística é simétrica ao redor do ponto de inflexão (ou seja, quando $N=0,5N_m$): se a porção da curva antes do ponto de inflexão sofrer rotação de 180° ela ficará exatamente no topo da parte da curva após este ponto.

O modelo de desaceleração consegue se ajustar bem aos pontos iniciais e, neste caso, apresenta a menor SRQ, sendo o melhor ajuste para os dados. Entretanto, a equação logística traz a vantagem adicional da simplicidade, tanto da equação quanto da interpretação dos resultados, sendo por isso, o modelo selecionado para realizar futuros ajustes. Esse tipo de estudo permite que o processo de produção de esporos seja avaliado e futuramente otimizado.

Com o objetivo de fazer um estudo comparativo, a equação logística foi ajustada aos dados de DALL'ONDER (1997), visto que ele foi o único autor que apresentou dados de produção de esporos ao longo da fermentação. Como pode ser visto na Figura 16, os valores de μ (parâmetro relacionado com a velocidade de produção de esporos) e de N_m (concentração máxima de esporos possível) são mais elevados do que aqueles obtidos até o momento neste trabalho. Talvez isto esteja relacionado com a superestimação do número de esporos que parece ter acontecido no

trabalho de DALL'ONDER (1997) (seção 5.2.3). De qualquer maneira, foi iniciada uma busca de condições ideais para melhorar o rendimento no presente trabalho.

FIGURA 16 - PERFIL DE PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *C. rosea* SOBRE TRIGO, COM AJUSTE DA EQUAÇÃO LOGÍSTICA (- - -) – DADOS DE DALL'ONDER (1997)



A determinação da cinética de produção de esporos permitiu realizar um melhor planejamento dos tempos de amostragem para os estudos posteriores. Além disso, ela foi utilizada em outros experimentos onde foram testados diferentes substratos e condições por se tratar de uma ferramenta importante na avaliação dos dados obtidos para que o processo de produção fosse otimizado. Por exemplo, supondo que a equação logística seja utilizada para comparar dois resultados, somente é necessário comparar os valores de μ e N_{\max} para determinar qual condição é melhor para a produção de esporos (resultados apresentados nas próximas seções).

5.4 SELEÇÃO DE UM SUBSTRATO PARA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *C. rosea* EM ERLLENMEYERS

Depois de terem sido realizados os estudos preliminares necessários (produção de esporos em placas para inóculo; cinética de liberação de esporos e formas de obtenção da amostra) e uma avaliação da cinética de produção de esporos, a próxima etapa consistiu na seleção de um substrato para a produção de esporos de *C. rosea*. Essa etapa do trabalho foi dividida em duas fases: na primeira foi realizado um estudo mais aprofundado sobre a produção de esporos utilizando grãos de trigo como substrato, visto que este é o substrato mais utilizado, e na segunda fase foram testados outros grãos como substratos.

5.4.1 Produção de Esporos de *C. rosea* Utilizando Diferentes Formas de Preparo do Substrato – Grãos de Trigo

A maioria dos autores utiliza grãos de trigo como substrato para a produção de esporos de *C. rosea*, mas foram encontradas diferentes formas de preparo deste substrato na literatura:

- grãos de trigo foram cozidos por 3 h, a seguir foram colocados em garrafas (200-300 g em cada) e autoclavados 2 vezes, com intervalo de um dia, a 121 °C e 103 kPa por 20 min (SUTTON et al., 2002);
- grãos de trigo foram cozidos (1 h) e autoclavados (121 °C, 30 min) (MORANDI et al., 2003);
- grãos de trigo foram embebidos com água destilada durante 6 h e fervidos durante 15 min, escorrida a água excedente do cozimento, os grãos (123,5 g) foram colocados em frascos de vidro translúcidos de 1 L, fechados e autoclavados (121 °C, 30 min) (DALL'ONDER, 1997);
- grãos de trigo embebidos em água foram colocados em vidros de 500 cm³ e autoclavados durante 1 h a 1 atm e 121 °C (VALDEBENITO-SANHUEZA et al., 1997);

- grãos de trigo umedecidos foram autoclavados em frascos de 250 mL (30 g grãos de trigo seco / frasco) (KÖHL et al., 1995).

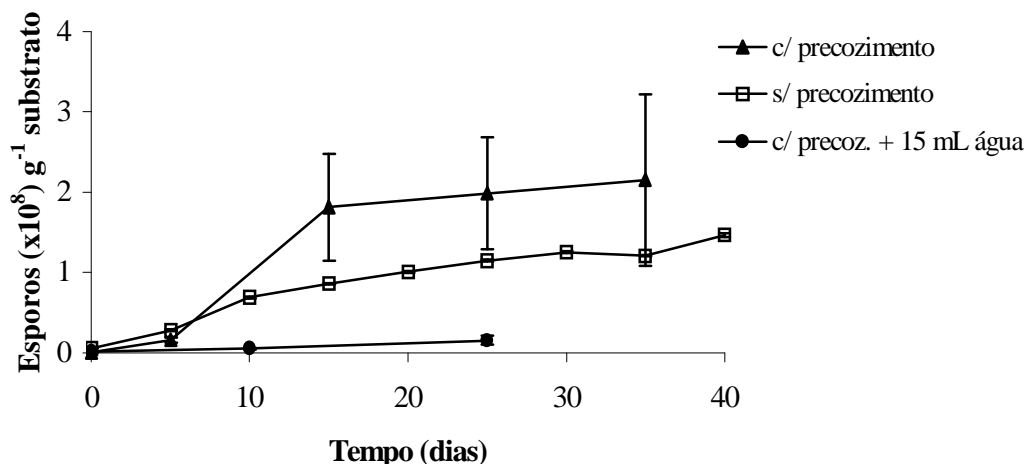
DALL'ONDER (1997) é o único que relata com mais detalhe o processo de produção de esporos que utilizou. Nos outros trabalhos a escassez de detalhes na descrição dos materiais e métodos empregados impede que comparações sejam feitas. Isso provavelmente ocorreu pois o objetivo desses trabalhos era testar a eficiência do agente de controle biológico *C. rosea* frente a diversos fungos, conforme relatado na Tabela 1, e não otimizar a produção de esporos. Devido a esta diversidade de informações, foram testadas três diferentes formas de preparo inicial do substrato (trigo) – uma mais simples onde somente foi adicionado substrato e água e foi autoclavado diretamente, e outras duas mais trabalhosas onde foi necessário fazer um pré-cozimento dos grãos de trigo – para verificar se isto teria alguma influência na produção de esporos por *C. rosea*:

- 10 g de grãos de trigo foram umedecidos com 10 mL de água destilada, em erlenmeyers (250 mL) e autoclavados (121 °C, 1 atm, 15 min), sendo que a amostragem foi realizada a cada 5 dias durante 40 dias, sacrificando-se três erlenmeyers por amostragem;
- forma de preparo utilizada por DALL'ONDER (1997), grãos de trigo foram embebidos em água por seis horas, fervidos por 15 min, colocados em erlenmeyers de 500 mL (50 g em cada) e autoclavados (121 °C, 1 atm, 30 min), sendo que a amostragem foi realizada nos dias 0, 4, 16, 25 e 32 após inoculação, sacrificando-se três erlenmeyers por amostragem;
- modificação da forma utilizada por DALL'ONDER (1997), grãos de trigo foram preparados da mesma forma, colocados em erlenmeyers de 250 mL (10 g de substrato por frasco), adicionados de mais 15 mL de água destilada em cada e autoclavados (121 °C, 1 atm, 15 min), sendo que a amostragem foi realizada nos dias 0, 10 e 25 após a inoculação, sacrificando-se três erlenmeyers por amostragem.

Conforme a Figura 17, nota-se que a forma de preparo inicial do substrato influenciou a produção de esporos de *C. rosea*. A terceira forma empregada, que

consiste de uma modificação da segunda, com adição de mais 15 mL de água ao substrato já cozido, foi a que mostrou a menor produção. Neste tratamento o substrato perdeu a forma de grãos e se transformou em uma massa compacta e pegajosa, o que ocorreu devido ao excesso de água que causou a extrusão do amido. Com isso, tanto a distribuição do inóculo quanto a aeração entre as partículas do substrato foram dificultadas, diminuindo o desenvolvimento da biomassa e a produção de esporos. Outra desvantagem deste tratamento surgiu durante o processo de contagem dos esporos na Câmara de Neubauer, pois a quantidade de impurezas misturada aos esporos foi muito elevada, o que dificultou a contagem. A partir do 25º dia de fermentação não foram mais retiradas amostras devido ao elevado índice de contaminação.

FIGURA 17 - PRODUÇÃO DE ESPOROS UTILIZANDO DIFERENTES FORMAS DE PREPARAÇÃO DO SUBSTRATO – GRÃOS DE TRIGO



A forma mais simples de preparo, sem pré-cozimento, apresentou uma produção de esporos intermediária. Neste caso houve pouca extrusão de amido, os grãos permaneceram visualmente inteiros e não compactados, o que favoreceu a aeração e a distribuição uniforme do inóculo, proporcionando melhor desenvolvimento do fungo. Os melhores resultados foram obtidos pela segunda forma de preparo, utilizada por DALL'ONDER (1997), onde é realizado um pré-cozimento dos grãos.

Essa forma de preparo forneceu um nível adequado de água para o cozimento dos grãos. Semelhante ao processo anterior, os grãos não formaram uma massa. Entretanto, neste caso notou-se um grande espalhamento dos pontos. Isso pode ter ocorrido devido à extrusão do amido que pode ter alterado a aeração ao longo do leito do substrato. Essa extrusão, que ocorreu em quantidade maior do que no processo anterior, pode, por um lado ter dificultado a disponibilidade de oxigênio, mas por outro, aumentado a disponibilidade do amido para o fungo.

Assim, as formas de preparo dos grãos foram influenciadas principalmente pela quantidade de água utilizada, a qual, associada à temperatura elevada tanto do pré-cozimento quanto do processo de autoclavagem, causou diferentes níveis de gelatinização e extrusão do amido. Conclui-se que quanto maior a quantidade de água, maior a extrusão do amido dos grãos de trigo e que quantidades muito elevadas de água afetam a produção de esporos. Optou-se pelo método sem pré-cozimento por ser mais prático e porque nele o substrato fica mais desagregado (menor extrusão de amido).

5.4.2 Produção de Esporos de *C. rosea* em Diferentes Substratos

O meio de cultivo utilizado num processo de fermentação deve satisfazer critérios como a disponibilidade de nutrientes, fácil preparação e esterilização e baixo custo. Para um sistema de FES, resíduos agrícolas e cereais são geralmente usados. A disponibilidade de nutrientes, os níveis de umidade e a superfície dos substratos sólidos podem influenciar tanto a quantidade quanto a qualidade dos esporos produzidos.

Além disso, sabe-se que substratos sólidos diferentes podem causar mudanças na germinação de esporos e que componentes do meio podem influenciar a atividade de enzimas no citoplasma dos esporos, as quais afetam a habilidade do fungo em penetrar em seu hospedeiro, afetando assim sua patogenicidade (MORIN, 1992)

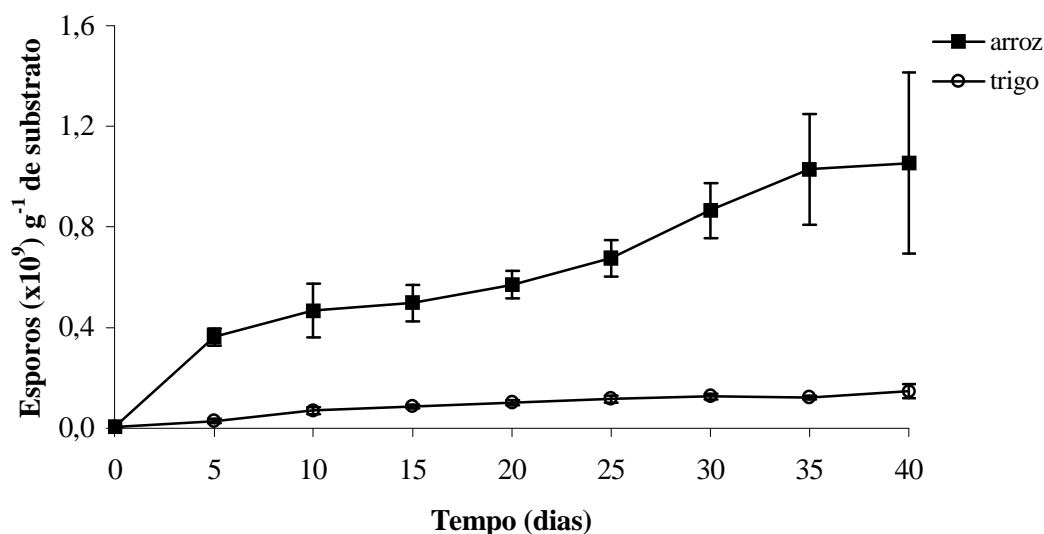
(McRAE & STEVENS, citado por MORDOCCO, 2000, p. 2-26)¹⁰. Um exemplo é a glucose, que causa uma elevada produção de esporos avirulentos, enquanto que na presença de amido são produzidas menores quantidades de esporos mas esses esporos são altamente virulentos. Isso sugere que um meio ambiente rico em glucose causa supressão do sistema enzimático essencial para a patogenicidade em fungos (STOWELL, citado por MORDOCCO, 2000, p. 2-26)¹¹.

O trigo é o substrato comumente utilizado para a produção de esporos por *C. rosea*, no entanto, não existe nenhum trabalho que explique o porquê desta escolha ou que demonstre que as maiores produções de esporos foram obtidas com ele. Ao contrário, ele parece ser apenas um substrato que deu certo e que foi adotado como protocolo, sendo executado ao longo do tempo com pequenas modificações. Frente a isto e considerando a importância do meio de cultivo na fermentação, foram testados outros substratos com o objetivo de selecionar o melhor deles para, na próxima etapa, realizar experimentos de otimização da produção.

Inicialmente foi feito um experimento comparando dois substratos que são muito utilizados em FES – trigo e arroz branco tipo agulhinha (Fig. 18). Estes substratos foram escolhidos por serem nutricionalmente completos, de alta disponibilidade e de baixo custo. O trigo, por ser o mais estudado, serviu como padrão de comparação da produção, sendo que a forma de preparo escolhida foi a mais simples, sem o pré-cozimento.

¹⁰ McRAE, C.F.; STEVENS, G.R. Role of conidial matrix of *Colletotrichum orbiculare* in pathogenesis of *Xanthium spinosum*. **Mycological Research**, v.94(7), p.890-896, 1990.

FIGURA 18 - PRODUÇÃO DE ESPOROS UTILIZANDO ARROZ E TRIGO COMO SUBSTRATO

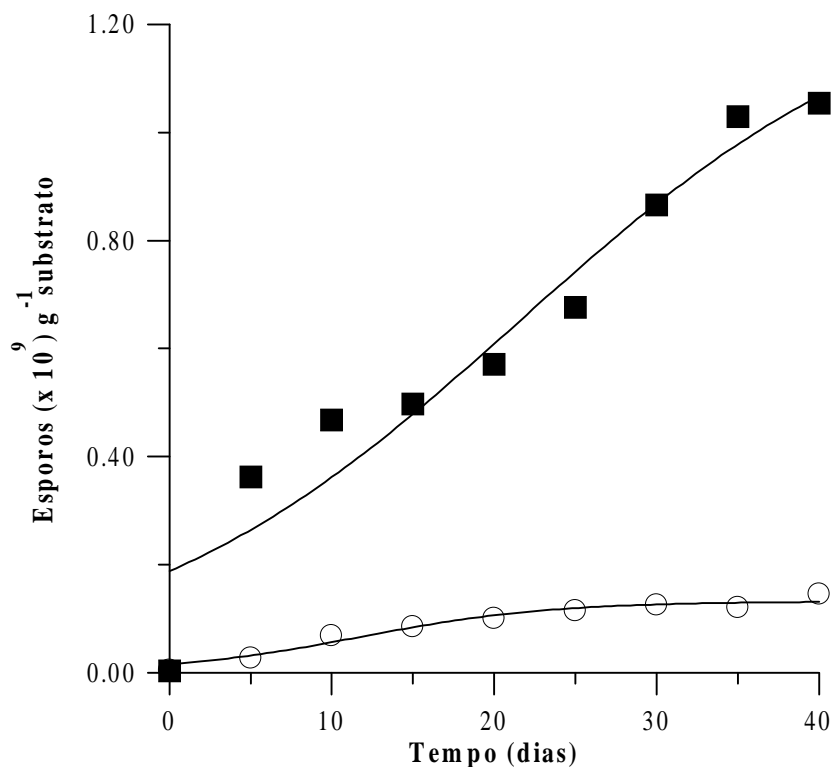


Como pode ser observado na Figura 18, a produção de esporos obtida utilizando arroz como substrato ($1,05 \times 10^9$ esporos g^{-1} substrato) foi uma ordem de magnitude maior àquela obtida sobre grãos de trigo ($1,47 \times 10^8$ esporos g^{-1} substrato). No entanto, o resultado alcançado com grãos de trigo é menor se comparado com alguns dados da literatura onde grãos de trigo também foram utilizado – $4,3 \times 10^9$ esporos g^{-1} obtido em 30 dias de fermentação por DALL'ONDER (1997) utilizando precocimento e 1 a 5×10^9 esporos g^{-1} obtido em 35 dias de fermentação por SUTTON et al. (1997).

Da mesma forma que para o trigo, a equação logística proporcionou um bom ajuste para a cinética de produção de esporos utilizando arroz branco como substrato (Fig. 19). Nota-se que quando o arroz foi utilizado a taxa de produção de esporos constante (μ) ($0,083 \text{ dia}^{-1}$) foi menor do que aquela obtida com trigo ($0,171 \text{ dia}^{-1}$). No entanto, a concentração máxima de esporos (N_m) foi de $1,298 \times 10^9$ esporos g^{-1} substrato para o arroz e de apenas $0,132 \times 10^9$ esporos g^{-1} substrato para o trigo.

¹¹ STOWELL, L.J. Submerged fermentation of biological herbicides. In: TeBeest, D.O. (ed) **Microbial control of weeds**; Chapman and Hall, New York, p.225-261.

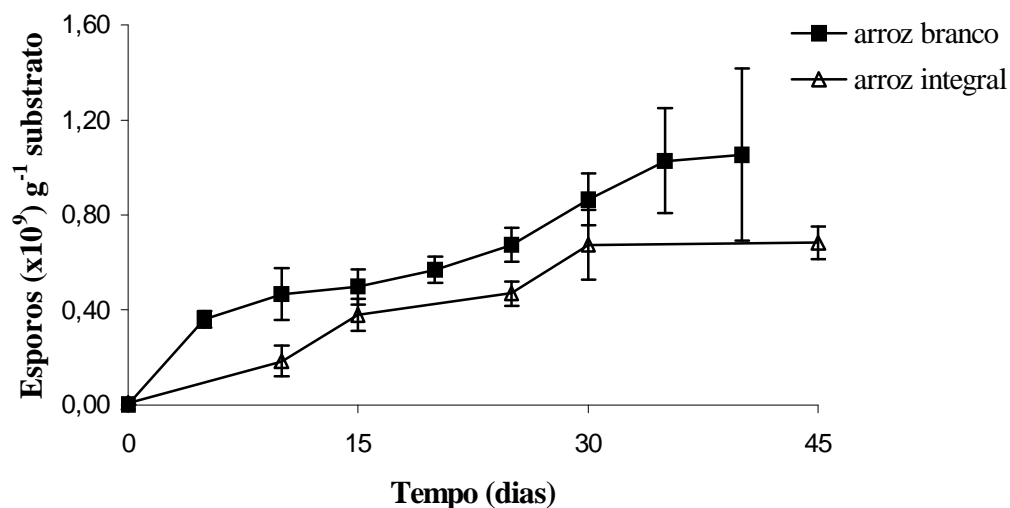
FIGURA 19 - PERFIL DE PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *C. rosea* SOBRE TRIGO (O) E ARROZ BRANCO (■), COM AJUSTE DA EQUAÇÃO LOGÍSTICA (—) AOS DADOS



Visto que o arroz proporcionou uma maior produção de esporos, foi feito um novo experimento para comparar dois tipos diferentes de arroz: arroz branco tipo agulhinha (anteriormente utilizado) e arroz cateto integral. As amostragens foram retiradas a cada 5 dias durante 40 dias para arroz branco e 45 dias para arroz integral.

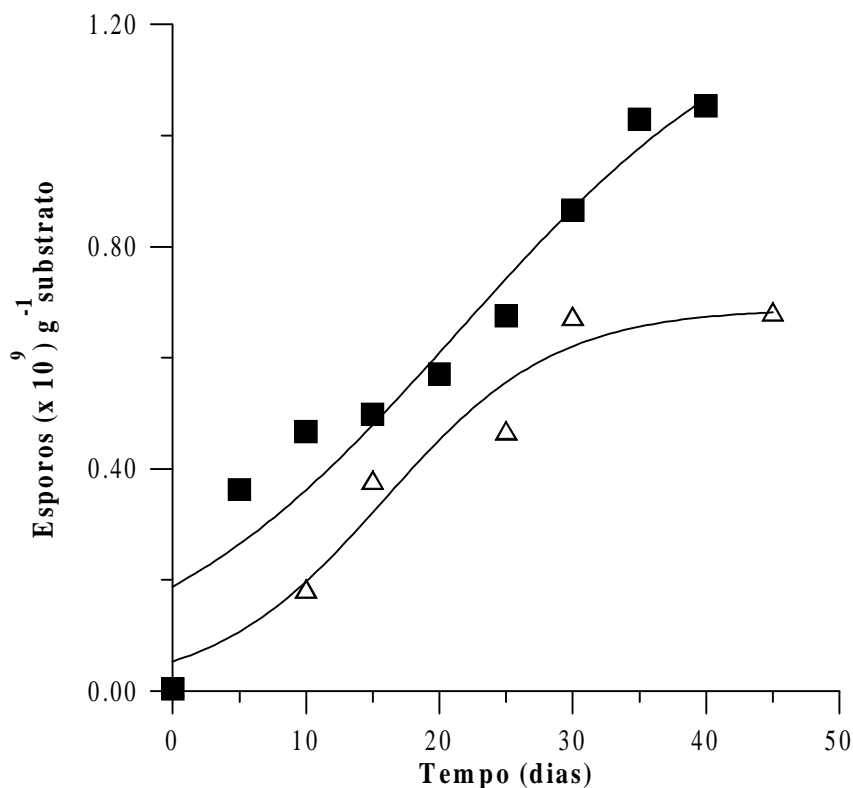
Como pode ser visto na Figura 20, houve uma pequena diferença, mas não significativa, na produção de esporos utilizando os dois tipos de arroz (produção de $1,05 \times 10^9$ esporos g^{-1} substrato com arroz branco e $0,68 \times 10^9$ esporos g^{-1} substrato com arroz integral). No entanto, o uso de arroz integral apresentou algumas desvantagens como a formação de um substrato mais pegajoso e com maior extrusão de amido do que o arroz branco, o que dificultou um pouco a contagem de esporos por liberar mais impurezas no processo de agitação feito para liberação dos esporos.

FIGURA 20 - PRODUÇÃO DE ESPOROS UTILIZANDO DOIS TIPOS DISTINTOS DE ARROZ COMO SUBSTRATO



A equação logística também proporcionou um bom ajuste para a cinética de produção de esporos utilizando arroz integral como substrato (Fig. 21). A taxa de produção de esporos específica (μ) obtida com arroz integral ($0,156 \text{ dia}^{-1}$), assim como àquela obtida com trigo, é maior do que a taxa obtida com arroz branco ($0,083 \text{ dia}^{-1}$). Entretanto, a concentração máxima de esporos (N_m) obtida com arroz branco ($1,298 \times 10^9$ esporos g^{-1} substrato) é superior àquela obtida com arroz integral ($0,689 \times 10^9$ esporos g^{-1} substrato).

FIGURA 21 - PERFIL DE PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *C. rosea* SOBRE ARROZ BRANCO (■) E ARROZ INTEGRAL (Δ), COM AJUSTE DA EQUAÇÃO LOGÍSTICA (—) AOS DADOS



Outro ponto importante a considerar é o econômico pois o arroz integral tem um custo maior do que o arroz branco, e uma vez que não tenha fornecido um aumento significativo na produção de esporos, esta opção de substrato foi descartada. Assim, baseando-se nos critérios de (1) maior produtividade de esporos, (2) propriedades desejáveis do substrato que não comprometessem a produção (por exemplo, o substrato não pode ser pegajoso demais) e (3) custo, o meio selecionado para os próximos estudos foi o arroz branco tipo agulhinha.

5.5 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO NO SUBSTRATO SELECIONADO

Após a seleção do arroz branco tipo agulhinha, foi realizado um estudo mais profundo sobre o efeito de algumas variáveis sobre o crescimento:

- (1) teor inicial de água;
- (2) condições de aeração;
- (3) concentração inicial de inóculo;
- (4) regime de agitação.

Estes estudos visaram a otimização das condições de cultivo uma vez que nenhum estudo referente à caracterização da influência destas variáveis sobre o crescimento e a produção de esporos de *C. rosea* foi encontrado na literatura.

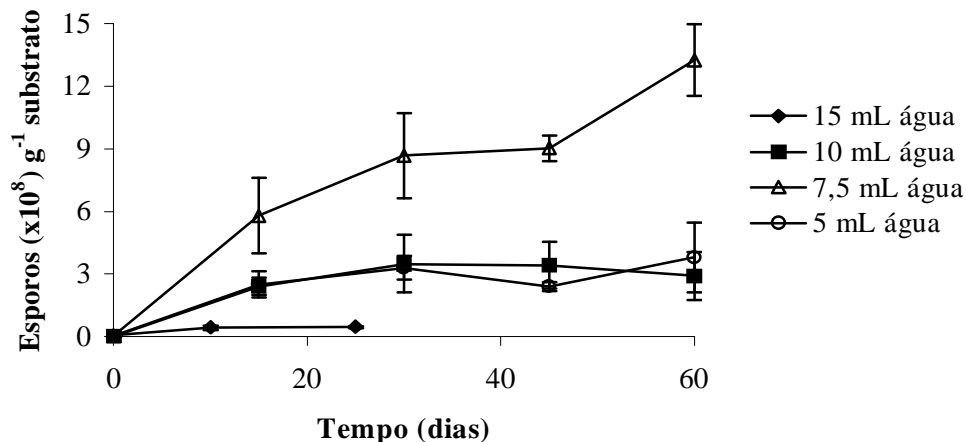
5.5.1 Produção de Esporos de *C. rosea* sobre Grãos de Arroz em Erlenmeyers em Diferentes Teores Iniciais de Água

Inicialmente foi realizado um experimento para verificar a influência do teor de água inicial. Para isso foram feitos testes em erlenmeyers onde foram acrescentadas diferentes quantidades de água destilada a 10 g de arroz branco antes do processo de autoclavagem. Foram testadas as seguintes condições:

- 10 g arroz e 15 mL de água destilada;
- 10 g arroz e 10 mL de água destilada (padrão utilizado nos experimentos anteriores);
- 10 g arroz e 7,5 mL de água destilada;
- 10 g arroz e 5 mL de água destilada.

A maior produção de esporos ($1,3 \times 10^9$ esporos g^{-1} de substrato) foi obtida quando foram adicionados 7,5 mL de água destilada (Fig. 22). Quantidades maiores ou menores de água causaram um decréscimo na produção de esporos.

FIGURA 22 – PRODUÇÃO DE ESPOROS EM DIFERENTES TEORES INICIAIS DE ÁGUA



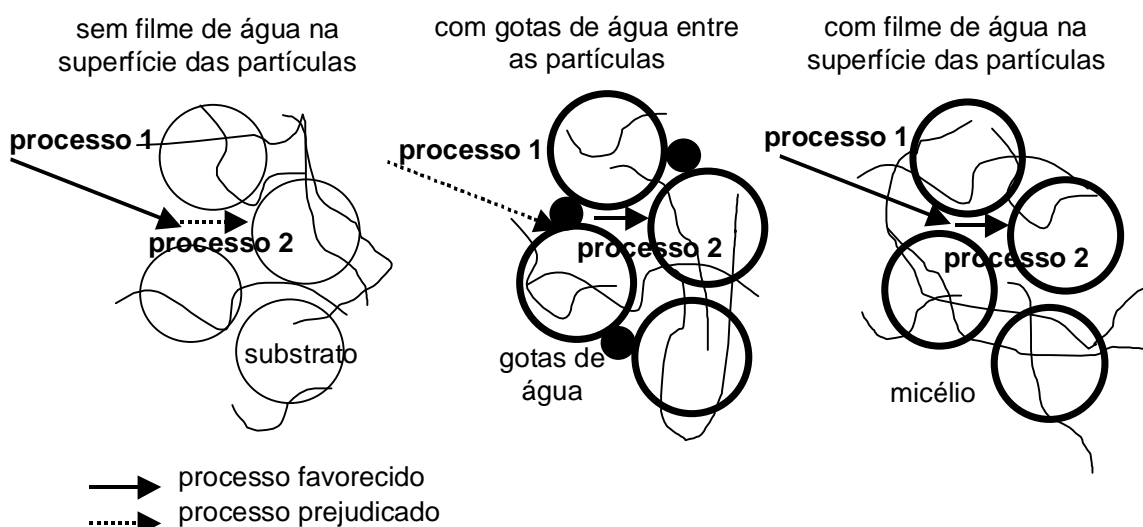
Em sistemas de FES com altos teores de água pode ocorrer a formação de gotas de água líquida nos espaços entre as partículas e a presença desta água representa uma barreira à difusão entre o *headspace* (espaço entre a camada de substrato e a tampa do erlenmeyer) e a superfície das partículas no interior do leito. Isso também causa redução na velocidade dos processos de transferência de massa nas partículas, como as difusões de solutos e gases para as células durante a fermentação, levando a uma diminuição na produção. Esse comportamento foi observado no tratamento em que os erlenmeyers receberam 15 mL de água.

Nesse tratamento também houve grande extrusão do amido, causando aglomeração do substrato, com formação de uma massa compacta e pegajosa. Isso dificultou a distribuição do inóculo e a aeração, resultando em uma baixa produção de esporos. Além disso, a contagem de esporos foi dificultada pela grande quantidade de impurezas que foram liberadas juntamente com os esporos durante o processo de extração destes. Esse comportamento foi semelhante àquele que ocorreu com o trigo preparado por uma modificação do processo de DALL'ONDER (1997), onde também foi verificado que o excesso de água foi prejudicial à produção de esporos.

Substratos com teores de umidade muito baixos diminuem a troca de calor porque ela é feita, nessa escala, principalmente por condução. Assim, quanto menor a

quantidade de água, menor a condutividade térmica do sólido. No caso da transferência de oxigênio, pode-se separar o processo em duas partes: (1) difusão nos espaços entre partículas (na qual a presença de gotas de água nos espaços inter-partículas prejudica a difusão de oxigênio) e (2) transferência de oxigênio entre a fase inter-partículas e a partícula em si – para a qual é bom ter um filme fino de água na superfície das partículas (Fig. 23).

FIGURA 23 - PROCESSOS DE TRANSFERÊNCIA DE OXIGÊNIO NOS ESPAÇOS ENTRE AS PARTÍCULAS DE SUBSTRATO (1) E ENTRE A FASE INTER-PARTÍCULAS E A PARTÍCULA EM SI (2)

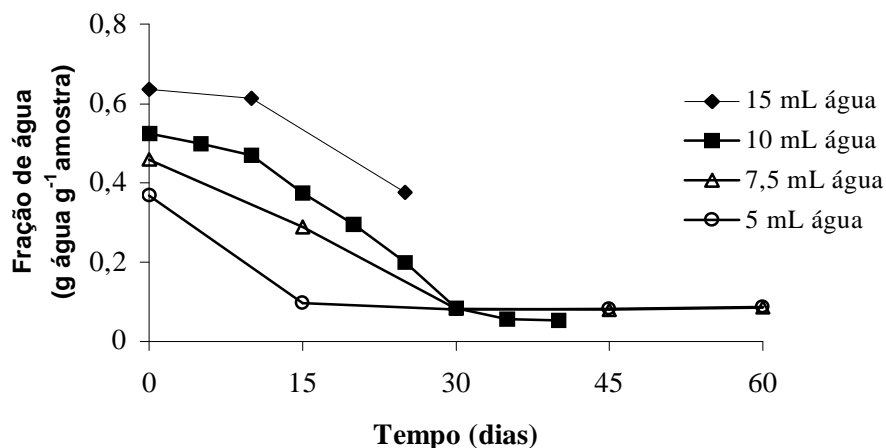


Em substratos pouco úmidos, a transferência de oxigênio entre a fase inter-partículas e a partícula em si é afetada pela diminuição destes filmes de água sobre as partículas do substrato. Além disso, devido à baixa umidade, a difusão de nutrientes presentes dentro da partícula para a biomassa na superfície é reduzida. Todos esses fatores acabam afetando a atividade microbiana, resultando em um decréscimo de produtividade (CARRIZALES; RODRIGUEZ; SARDINA, HESSELTINE, citados por ELLAIAH; SRINIVASULU; ADINARAYANA, 2004, p.532)¹².

¹² CARRIZALES, V.; RODRIGUEZ, H.; SARDINA. Determination of specific growth rate of molds as semi solid cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, v.23, p.321-333, 1981. HESSELTINE, C.W. SSF: an overview. *Int Biodeterioration*, v.23, p.79-89, 1979.

O teor de umidade do substrato exerce uma grande influência sobre a performance de FES, entretanto, seu controle durante o processo é muito difícil. A variação na disponibilidade de água foi observada nesse experimento através da quantificação da fração de água das amostras ao longo do tempo (g de água / g total de amostra) (seção 4.15.1), sendo que em todos os tratamentos o teor de umidade no substrato diminuiu ao longo da fermentação (Fig. 24).

FIGURA 24 - VARIAÇÃO DA FRAÇÃO DE ÁGUA EM TRATAMENTOS COM DIFERENTES TEORES INICIAIS DE ÁGUA



O tratamento onde foi adicionado 15 mL de água é o que apresenta o teor de água inicial mais elevado, em torno de 63,6% (p/p base úmida). Esse teor de água diminuiu ao longo do tempo, mas de forma menos acentuada que nos outros tratamentos. Com 30 dias de fermentação os outros três tratamentos decaíram para 8,1% de umidade, sendo que o tratamento onde foi adicionado apenas 5 mL de água foi o que apresentou um decaimento mais brusco, pois nos primeiros 15 dias decaiu de 36,8% para 9,7%

A disponibilidade de água muda durante o curso da fermentação devido às variações na quantidade de água. No sistema de fermentação adotado neste trabalho, com o uso de uma camada fina de substrato, isso ocorreu principalmente devido à diferença entre a umidade relativa do ar no substrato, no *headspace* e na atmosfera da

sala, visto que o substrato vai trocar água com o *headspace* do frasco, e este, por sua vez, vai trocar água tanto com o substrato quanto com a atmosfera do lado de fora do tampão. Além disso, a variação da disponibilidade de água pode ser afetada pela ação dos microrganismos sobre o substrato, como a oxidação dos carboidratos que libera água, e por um aumento do calor metabólico capaz de elevar a temperatura do substrato, que causa um decréscimo no teor de umidade devido a evaporação. Assim, tanto a evaporação quanto a formação de água ocorrem em processos de FES, sendo que o aumento ou o decréscimo na disponibilidade refletirá a diferença na contribuição relativa de cada processo (DOELLE; MITCHELL; ROLZ, 1992).

A adição de 7,5 mL de água para cada 10 g de arroz branco tipo agulhinha foi adotada como padrão. Além disso, foi observado que o fungo precisa de mudanças no teor de água durante o processo, um valor mais alto no início para estimular o crescimento e, depois disto, um decréscimo para estimular a esporulação.

5.5.2 Produção de Esporos de *C. rosea* sobre Grãos de Arroz com Diferentes Métodos de Fechamento dos Erlenmeyers

Alguns autores relatam que uma secagem ao longo do processo ajuda a estimular a produção de esporos (SUTTON et al., 1997), (SUTTON et al., 2002). Na literatura foram encontrados alguns trabalhos que empregam técnicas de secagem do meio de cultivo colonizado por *C. rosea*:

- após um período inicial de crescimento do micélio (14 a 18 dias), foi feita uma secagem lenta do substrato colonizado (SUTTON et al., 1997);
- após ser colonizado pelo fungo, os grãos foram lentamente secados com ar durante 15 dias a 22-25 °C (MORANDI et al., 2003);
- após 14 dias de incubação, a formulação foi espalhada em uma fina camada em papel filtro esterilizado e seca por 2 dias em câmara de fluxo laminar a 21 ± 3 °C (JENSEN; KNUDSEN; JENSEN, 2002);

- no 12º dia, quando os grãos estavam cobertos pelo micélio, a tampa de metal das garrafas foi substituída por papel de fotocópia esterilizado para permitir que as culturas secassem lentamente (SUTTON et al., 2002);
- garrafas, com as tampas desapertadas, foram mantidas na bancada por 3 dias, após isto os substratos colonizados foram transferidos para bandejas plásticas esterilizadas cobertas com filme plástico transparente e mantidas sob lâmpadas fluorescentes. Depois o filme foi removido e os substratos fossem secos com ar por 2 dias (PENG; SUTTON; KEVAN, 1992).

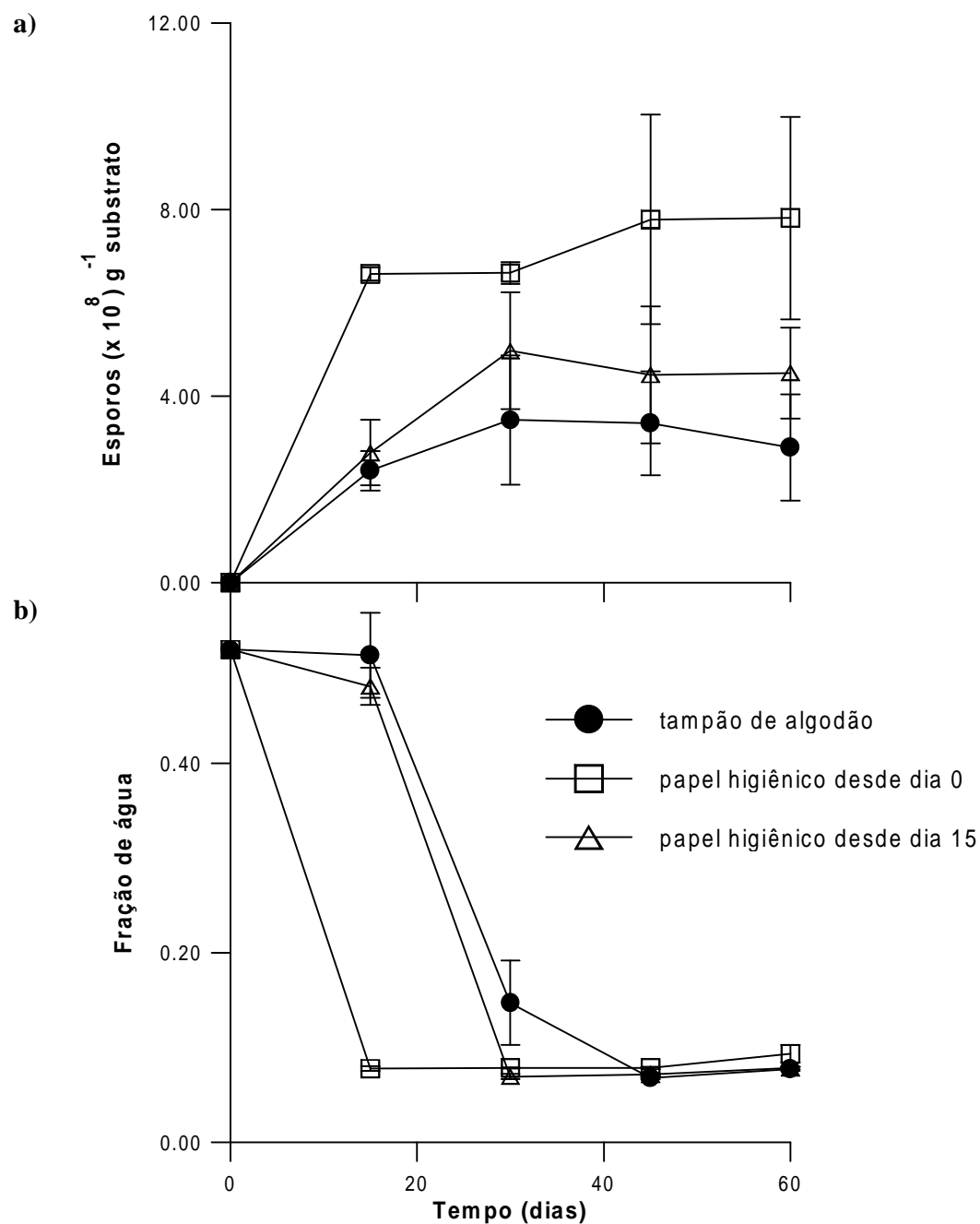
Os autores não fornecem maiores detalhes sobre os procedimentos de secagem realizados. Aparentemente a secagem é feita somente no período final da fermentação, após a colonização do substrato pelo fungo. Além disso, nenhum trabalho apresenta a quantificação do teor de água no substrato ao longo do processo. Assim, na ausência de um perfil do teor de água, torna-se difícil interpretar estes resultados.

Foi feito um estudo para verificar se o uso de tampões diferentes, que representam barreiras diferentes a difusão entre o *headspace* e as vizinhanças e que fornecem taxas de secagem diferentes, afetaria a produção de esporos de *C. rosea*. Foram testadas três diferentes formas de fechamento que representaram barreiras diferentes à troca de gases (neste caso o oxigênio, o gás carbônico e, principalmente, o vapor de água) entre a sala e o *headspace* do frasco:

- tampões de algodão e gaze (padrão utilizado nos experimentos anteriores) durante os 60 dias de fermentação;
- pedaço de papel higiênico durante os 60 dias de fermentação;
- tampões de algodão e gaze durante os primeiros 15 dias de fermentação, substituídos por pedaços de papel higiênico que permaneceram até o final da fermentação.

Como pode ser observado na Figura 25, a maior produção de esporos de *C. rosea* foi obtida no tratamento onde o papel higiênico foi utilizado durante toda a fermentação ($7,8 \times 10^8$ esporos g^{-1} de substrato), sendo esse o tratamento que apresentou a diminuição mais acentuada do teor de água, decaindo de 52% para 7,8% já nos 15 dias iniciais (Fig. 25).

FIGURA 25 - PRODUÇÃO DE ESPOROS (A) E VARIAÇÃO DA FRAÇÃO DE ÁGUA (B) EM TRÊS CONDIÇÕES DE AERAÇÃO DIFERENTES



O tratamento onde o papel higiênico foi utilizado a partir do 15º dia de fermentação apresentou uma produção de esporos menor, assim como o tratamento onde foi utilizado tampão de algodão e gaze durante todo o processo. Esses dois

tratamentos apresentaram variações do teor de umidade semelhantes, sendo que nos primeiros 15 dias o teor se manteve em torno de 50% para ambos. Após a substituição do tampão papel higiênico, o teor de umidade decaiu para 7,0% num período de 15 dias (30º dia da fermentação). No tratamento em que o tampão permaneceu, o decaimento foi um pouco menor, chegando a um teor de 14,7% no 30º dia de fermentação.

O papel higiênico atuou como uma barreira de difusão menos eficiente do que o tampão de gaze e algodão, permitindo uma maior disponibilidade de oxigênio e uma secagem mais rápida (perda de umidade) do meio de cultivo, o que levou a uma maior produção de esporos. Isso ocorreu porque a secagem do meio colonizado favoreceu a produção de hifas com conidióforos penicilados, que possuem uma taxa de produção de esporos maior do que a dos conidióforos verticilados, sendo que esses geralmente predominam em condições de alta umidade constante (SUTTON et al., 1997). Além disso, LARROCHE et al. (1992) (citados por MORDOCCO, 2000, p.5-2)¹³ sugeriu que a água é um fator limitante para o crescimento dos fungos e que a esporulação requer uma baixa atividade de água.

Embora a produção de esporos tenha sido um pouco maior com o uso de papel higiênico para fechar os erlenmeyers, ele não foi utilizado nos experimentos seguintes por ser um material muito complicado para trabalhar, visto que rasga facilmente e não pode ser esterilizado, causando contaminações. Assim, essa condição foi armazenada para, talvez, ser empregada em experimentos futuros enquanto os tampões feitos de algodão e gaze continuaram a ser utilizados.

5.5.3 Produção de Esporos de *C. rosea* sobre Grãos de Arroz em Erlenmeyers em Diferentes Concentrações Iniciais de Inóculo

O tipo de inóculo usado é possivelmente um dos parâmetros mais importantes que afeta a duração do ciclo fermentativo e a produção de propágulos. Podem ser

¹³ LARROCHE, C.; THEODORE, M.; GROS, J.B. Growth and sporulation behaviour of *Penicillium roquefortii* in solid state fermentation: effect of the hydric parameters of the medium. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.38(2), p.183-187, 1992.

utilizados fragmentos miceliais ou esporos. Acredita-se que o uso de fragmentos miceliais evitaria a fase de germinação e diminuiria o tempo para iniciar a fase de crescimento, enquanto que o uso de esporos proporcionaria uma produção de esporos maior mas em um período de tempo mais longo por ter que passar obrigatoriamente pela fase de germinação (MORIN, 1992). O tipo usado e a concentração do inóculo afetam a produção de esporos total, mas a maneira pela qual isso ocorre varia para cada fungo (SOLOMONS, citado por MORDOCCO, 2000, p.2-22)¹⁴.

Além disso, a quantidade de água que é adicionada no processo de inoculação tem duas funções importantes: (1) afeta o crescimento e a esporulação do fungo e (2) determina a facilidade de misturar o inóculo e o substrato. Essa quantidade de água não deve ser nem muito baixa nem muito alta. Como regra geral, uma quantidade maior de líquido vai permitir uma boa distribuição do inóculo com um mínimo de agitação mas pode causar problemas de difusão dos gases no leito se encher os espaços inter-partículas. Por outro lado, uma quantidade pequena de líquido no inóculo vai gerar a necessidade de uma agitação vigorosa na hora de adicioná-lo ao substrato para obter uma distribuição uniforme entre as partículas, o que pode danificar o substrato, esmagando-o, fazendo com que ele se torne uma pasta; ou o próprio inóculo, principalmente se ele for constituído por micélio, já que as hifas são muito mais sensíveis que os esporos.

Assim, o volume de inóculo utilizado não deve aumentar muito a quantidade de água do meio, pois, como já foi relatado em experimentos anteriores, o excesso de água prejudica tanto o desenvolvimento do fungo por tornar o substrato pegajoso e compacto, quanto a sua esporulação, visto que esta é favorecida em ambientes com atividades de água mais baixas (MORDOCCO, 2000).

Na literatura foram encontrados diferentes tipos e concentrações de inóculos utilizadas em cultivos de *C. rosea*:

- 10 mL de uma suspensão (10^7 esporos mL^{-1}) foi aplicada em 300 g de grãos de trigo (MORANDI et al., 2003);

¹⁴ SOLOMONS, G.L. Submerged culture production of mycelial biomass. In: Smith, J.E. and Berry, D. (eds) **The Filamentous Fungi**, v.1, Industrial Mycology, Edward Arnold, London, p.249-264, 1975.

- 123,5 g de grãos de trigo foram inoculados com 5 mL de uma suspensão de 10^7 esporos mL^{-1} (DALL'ONDER, 1997);
- sementes de trigo foram inoculadas com 10 ml de uma suspensão de 10^6 esporos mL^{-1} obtida pela lavagem da superfície de uma cultura do fungo em BDA (VALDEBENITO-SANHUEZA et al., 1997);
- meio (39 g/frasco) foi inoculado com dois discos de 5 mm de diâmetro retirados de colônias do fungo (JENSEN; KNUDSEN; JENSEN, 2002);
- 200 – 300 g de grãos por frasco foram inoculadas com 10 mL de inóculo (10^7 esporos mL^{-1}) feitos a partir de culturas do fungo em BDA (SUTTON et al., 2002);
- farinha de milho (300 g), farelo usado para alimentar aves domésticas (300 g), farelo de trigo (50 g) e farelo de aveia (50 g), foram inoculados com 50 mL de uma suspensão de esporos (10^7 esporos mL^{-1}) por frasco (PENG; SUTTON; KEVAN, 1992).

Apesar dos vários exemplos de protocolo, eles não seguem nenhum padrão de relação entre quantidade de inóculo e quantidade de substrato. Além disso, não há informação na literatura acima citada sobre otimização das estratégias de inoculação utilizadas. Devido à falta de homogeneidade das informações, foram testadas 5 concentrações diferentes para avaliar seu efeito sobre a produção de esporos:

- C1 = $1,2 \times 10^8$ esporos mL^{-1} = 6×10^6 esporos g^{-1} substrato seco;
- C2 = $4,8 \times 10^7$ esporos mL^{-1} = $2,4 \times 10^6$ esporos g^{-1} substrato seco;
- C3 = $2,0 \times 10^7$ esporos mL^{-1} = 1×10^6 esporos g^{-1} substrato seco (padrão utilizado nos experimentos anteriores);
- C4 = $1,8 \times 10^6$ esporos mL^{-1} = 9×10^4 esporos g^{-1} substrato seco;
- C5 = $1,8 \times 10^5$ esporos mL^{-1} = 9×10^3 esporos g^{-1} substrato seco.

A maior produção de esporos foi obtida por três tratamentos: quando a concentração de inóculo utilizada foi de $1,8 \times 10^6$ esporos mL^{-1} ($2,98 \times 10^9$ esporos g^{-1} de substrato); quando foi utilizada uma concentração 10 vezes maior, igual a $2,0 \times 10^7$ esporos mL^{-1} ($2,84 \times 10^9$ esporos g^{-1} de substrato) e quando foi utilizada uma concentração 10 vezes menor, igual a $1,8 \times 10^5$ esporos mL^{-1} de inóculo ($2,88 \times 10^9$

esporos g^{-1} de substrato) (Fig. 26). Assim, a concentração ótima de inóculo não se restringiu a um ponto, ao contrário, houve a formação de um intervalo de concentrações ótimas que forneceram produções de esporos elevadas (Fig. 27).

FIGURA 26 - PRODUÇÃO DE ESPOROS UTILIZANDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE INÓCULO

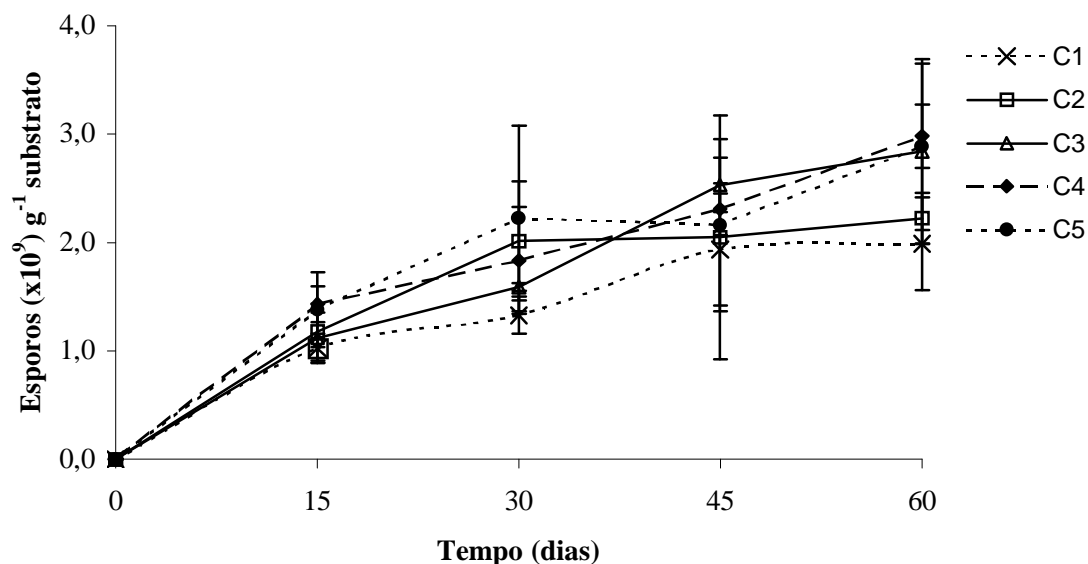
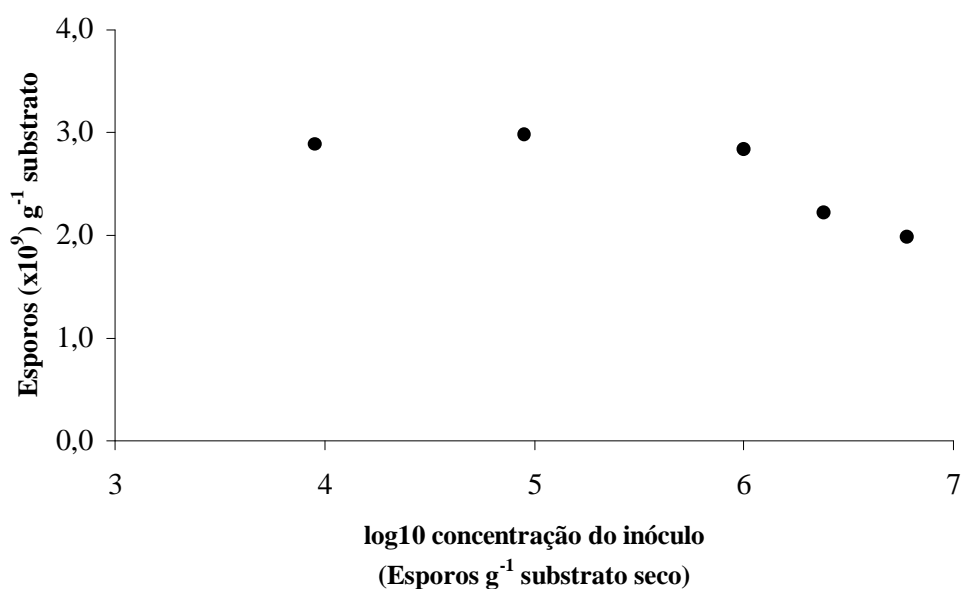


FIGURA 27 - COMPARAÇÃO ENTRE A PRODUÇÃO MÁXIMA DE ESPOROS OBTIDA E AS CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE INÓCULO UTILIZADAS



Nos dois tratamentos onde foram utilizadas concentrações mais elevadas de inóculo ($1,2 \times 10^8$ esporos mL^{-1} e $4,8 \times 10^7$ esporos mL^{-1}) notou-se um decréscimo na produção de esporos, $1,99 \times 10^9$ esporos g^{-1} de substrato e $2,22 \times 10^9$ esporos g^{-1} de substrato, respectivamente, e uma maior formação de micélio sobre os grãos de arroz. Isso também foi visto na Figura 27, onde, após o platô das concentrações que forneceram maiores produções, houve um decréscimo, indicando que a partir de uma concentração de 1×10^6 esporos g^{-1} substrato seco, quanto maior a concentração do inóculo, menor a produção máxima de esporos.

O uso de um inóculo em concentração elevada pode causar uma produção inicial excessiva de biomassa, levando a uma depleção dos nutrientes do substrato necessários para a produção dos esporos (ELLAIAH, SRINIVASULU; ADINARAYANA, 2004). Pode ocorrer também falta de espaço físico no início do processo, o que dificultaria a germinação dos esporos, o desenvolvimento das hifas e a formação de novas estruturas reprodutivas, associado a uma depleção de nutrientes e de oxigênio. Além disso, os esporos podem produzir alguma substância que, quando em altas concentrações, pode inibir a germinação (MORDOCCO, 2000).

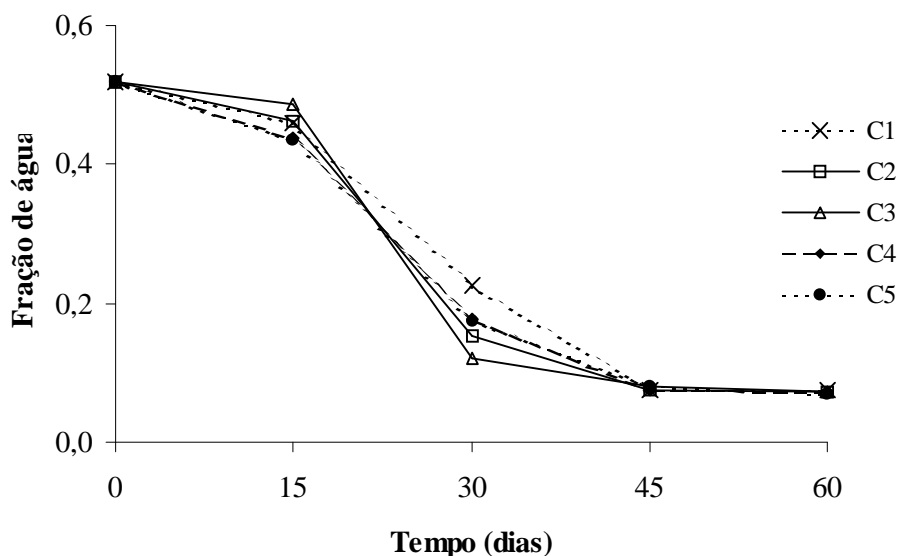
Ao contrário, quando concentrações menores são aplicadas, o espaço para o desenvolvimento dos esporos e formação de novas estruturas é maior, assim como é maior a disponibilidade de nutrientes e oxigênio para as microcolônias pois a competição é menor (MORDOCCO, 2000). No entanto, essas possíveis explicações para o efeito da concentração não foram confirmadas por estudos microscópicos no presente estudo.

O efeito das diferentes concentrações de inóculo utilizadas na produção de esporos foi pequeno, uma vez que, mesmo com várias ordens de magnitude de diferença na concentração, o rendimento final de esporos variou somente 33,24%. Dessa forma, inóculos mais baixos podem ser utilizados, desde que não comprometam a reprodutibilidade devido a problemas na distribuição uniforme. Assim, uma dada quantidade de inóculo pode ser utilizada para inocular quantidades maiores de substrato, ou, em outras palavras, para inocular uma tonelada de substrato, em vez de

precisar de 1250 placas (para a concentração 10^7 esporos mL^{-1} adotada como padrão) seriam necessárias apenas 12,5 placas (concentração de 10^5 esporos mL^{-1}).

Como esperado, não houve diferença no teor de umidade ao longo da fermentação para os tratamentos, visto que a quantidade inicial de água e as condições de fechamento e incubação dos erlenmeyers foram iguais. Eles apresentaram comportamentos semelhantes, sendo que o teor inicial de 52% decaiu para 46%, em média, durante os primeiros 15 dias, decaiu novamente até o 30º dia, ficando em torno de 12 a 22%, estabilizou ao redor de 7,9% no 45º dia e se manteve até o final (Fig. 28).

FIGURA 28 - VARIAÇÃO DA FRAÇÃO DE ÁGUA EM TRATAMENTOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE INÓCULO



Após análise destes resultados, optou-se por continuar utilizando a concentração de inóculo adotada inicialmente como padrão ($2,0 \times 10^7$ esporos mL^{-1}) pois ela se localiza no intervalo onde a produção de esporos obtida é máxima e permite manter consistência nos métodos de realização dos experimentos. Entretanto, para uma produção em grande escala de inóculo, visando inocular grandes quantidades de substrato, a concentração de inóculo utilizada pode ser 100 vezes menor (10^5 esporos mL^{-1}).

5.5.4 Produção de Esporos de *C. rosea* sobre Grãos de Arroz em Erlenmeyers em Diferentes Regimes de Agitação

A determinação de um nível ótimo de agitação é essencial para obter uma produção máxima em um sistema aeróbio. O uso de agitação durante a fermentação facilita a distribuição do oxigênio através do sistema (LONSANE et al., citado por MORDOCCO, 2000, p.2-23)¹⁵. Além disso, a agitação do meio promove transferência de massa e calor. Isso permite um melhor crescimento, utilização dos substratos e, conseqüentemente, uma maior produção de esporos, o que é importante principalmente em sistemas de fermentação em escalas maiores.

Entretanto, as forças de cisalhamento que ocorrem durante a agitação podem ser deletérias ao crescimento microbiano em sistemas de FES. A esporulação pode ser inibida por essas forças que fragmentam as hifas aéreas na superfície das partículas do substrato resultando em um decréscimo no crescimento do fungo, no desenvolvimento de conidióforos e, conseqüentemente, na produção de esporos (MORDOCCO, 2000).

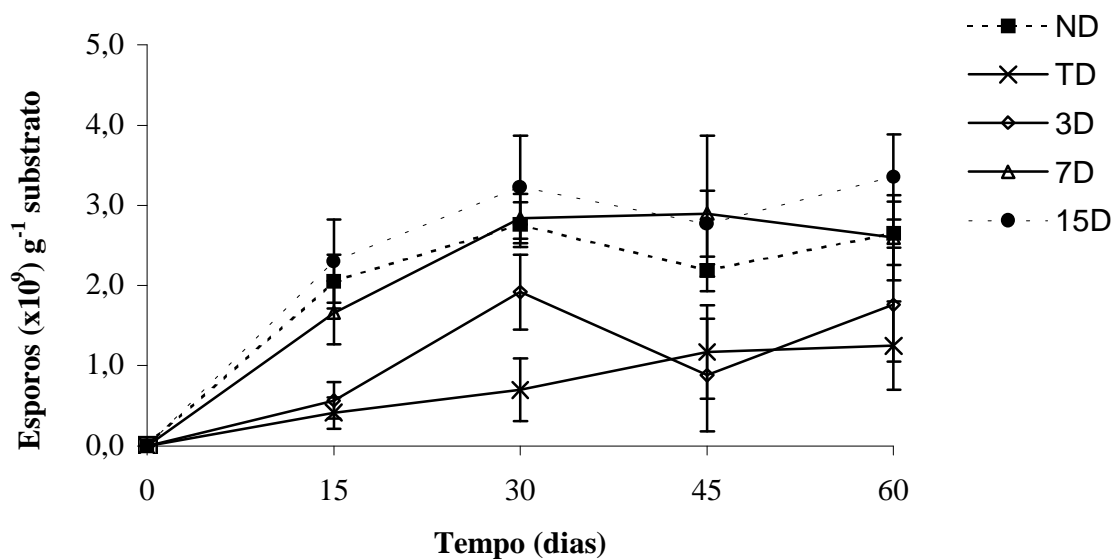
O uso de agitação para a produção de esporos de *C. rosea* é relatado apenas por SUTTON et al. (2002), que agitou as garrafas onde produzia este fungo a cada 2-3 dias para evitar o entrelaçamento dos grãos pelo micélio. Não foram encontradas informações sobre o efeito da agitação na produção de esporos. Devido a isso, foi feito um experimento para avaliar o efeito de diferentes frequências de agitação manual sobre a produção de esporos. Os tratamentos aplicados foram:

- erlenmeyers não foram agitados durante os 60 dias de fermentação (ND) (padrão utilizado nos experimentos anteriores);
- erlenmeyers agitados a cada 15 dias (15D);
- erlenmeyers agitados a cada 7 dias (7D);
- erlenmeyers agitados a cada 3 dias (3D);
- erlenmeyers agitados todos os dias (TD).

A agitação foi feita de forma manual com duração de 1 minuto por erlenmeyer, com amplitude e frequência dos movimentos padronizados.

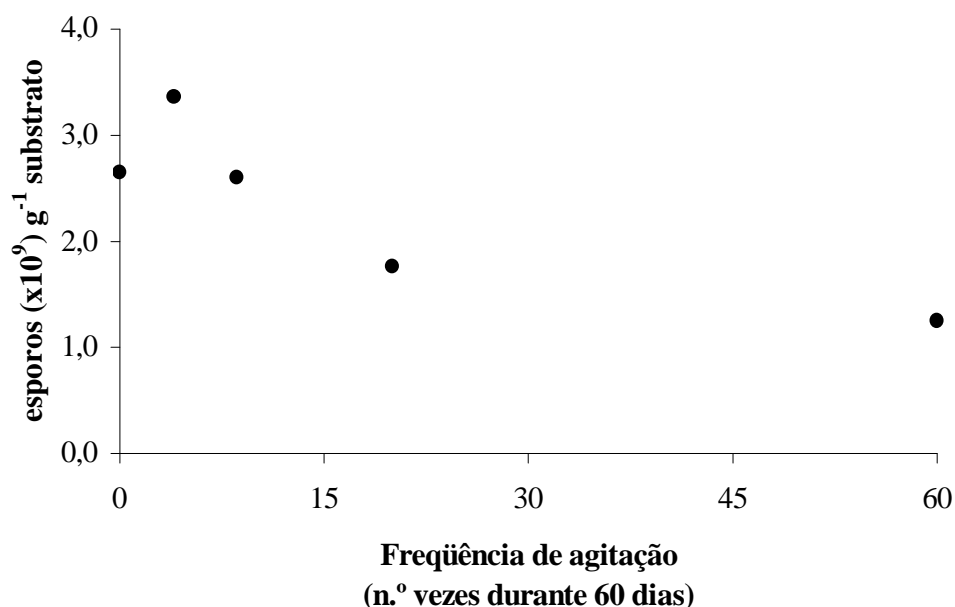
A maior produção de esporos ($3,36 \times 10^9$ esporos g^{-1} de substrato) foi obtida quando os erlenmeyers foram agitados a cada 15 dias. Produções similares foram observadas nos erlenmeyers que foram agitados a cada 7 dias ($6,60 \times 10^9$ esporos g^{-1} de substrato) e naqueles que não foram agitados durante a fermentação ($2,65 \times 10^9$ esporos g^{-1}) (Fig. 29). Ao contrário, os erlenmeyers submetidos a agitação todos os dias e a cada 3 dias apresentaram produções de esporos mais baixas, $1,25 \times 10^9$ esporos g^{-1} de substrato e $1,76 \times 10^9$ esporos g^{-1} de substrato, respectivamente. Portanto, o regime ótimo de agitação é aquele feito a cada 15 dias, o qual forneceu a maior produção de esporos. A agitação em maior ou menor frequência foi prejudicial a produção de esporos (Fig. 30).

FIGURA 29 - PRODUÇÃO DE ESPOROS EM DIFERENTES REGIMES DE AGITAÇÃO



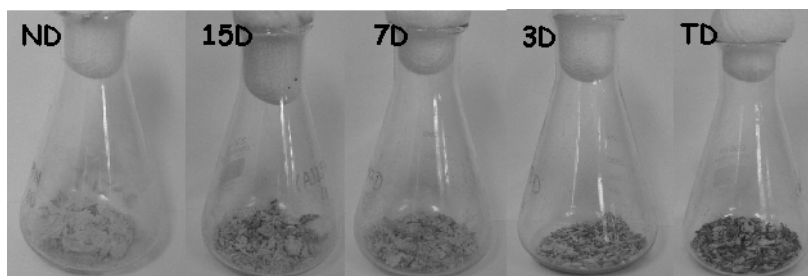
¹⁵ LONSANE, B.K.; GHILDYAL, N.P.; BUDIATMAN, S.; RAMAKRISHNA, S.V. Engineering aspects of solid state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v.7(6), p.258-268, 1985.

FIGURA 30 – COMPARAÇÃO ENTRE A PRODUÇÃO MÁXIMA DE ESPOROS OBTIDA E OS DIFERENTES REGIMES DE AGITAÇÃO



Além da produção de esporos, os regimes de agitação também afetaram os aspectos visuais do substrato fermentado. Nos tratamentos onde a agitação foi feita com maior frequência (TD, 3D e 7D) notou-se uma mudança na coloração dos grãos de arroz, os quais tornaram-se mais escuros com o passar do tempo. Além disso, nesses tratamentos a agitação causou o rompimento das hifas e elas não puderam se entrelaçar ao substrato e, como consequência, os grãos ficaram extremamente soltos. No regime de agitação feito a cada 15 dias, essa coloração escura também foi notada mas em menor proporção, sendo que a coloração rosa salmão típica de *C. rosea* prevaleceu durante os 60 dias de cultivo. O comportamento do substrato neste caso foi intermediário, com formação de pequenos aglomerados de grãos no meio dos grãos soltos. Nos erlenmeyers que não foram agitados, a coloração do micélio e dos esporos permaneceu rósea durante toda a fermentação. Nesse tratamento houve a formação de uma massa de substrato mais compacta, ou seja, de um aglomerado (Fig. 31).

FIGURA 31 - ASPECTOS DO MEIO DE CULTIVO NOS DIFERENTES REGIMES DE AGITAÇÃO



ND - erlenmeyers não agitados; 15D - erlenmeyers agitados a cada 15 dias; 7D - erlenmeyers agitados a cada 7 dias; 3D - erlenmeyers agitados a cada 3 dias; TD - erlenmeyers agitados todos os dias.

Nos erlenmeyers submetidos a uma agitação mais freqüente, as hifas sofreram maiores danos. Isso pode ter causado um tipo de autólise da biomassa, através da liberação de enzimas que reagiram com a biomassa ou, ainda, com componentes do substrato, que fizeram com que a fermentação adquirisse essa coloração mais escura. Uma outra explicação possível seria a produção de melanina pelo fungo em resposta ao dano mecânico.

Este experimento mostrou que agitação excessiva de *C. rosea* crescendo sobre grãos de arroz diminui a produção de esporos. Nota-se que a agitação manual não é a forma ideal porque ela varia muito em termos de força e impacto. Entretanto, como o objetivo deste trabalho é transferir a tecnologia para o produtor, a agitação manual seria a mais adequada.

5.6 TESTE DE CULTIVO EM SACOS

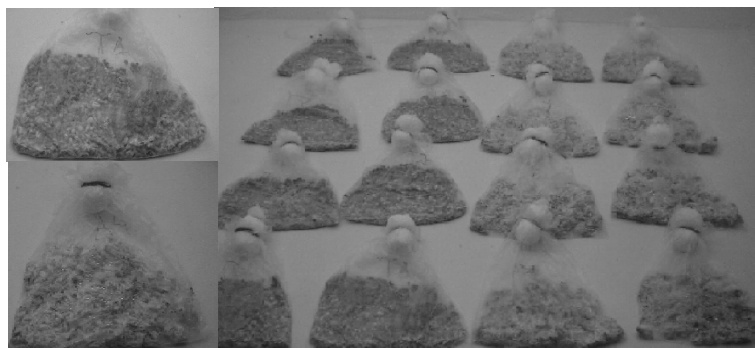
Na literatura muitos trabalhos tem como objetivo a produção em grande escala de fungos. A maioria descreve pesquisas para otimização da produção de esporos por um isolado específico em um dado substrato, mas raramente passam dos testes em

laboratório para testes de produção em escalas maiores (SILMAN et al.; IBRAHIM & LOW, citados por JENKINS et al., 1998, p.22N)¹⁶.

A finalidade desta pesquisa foi de otimizar a produção de esporos de *C. rosea*, mas sempre visando um processo de produção apropriado aos produtores. Para isso foi necessário encontrar um sistema de reação adequado a produção de esporos pelo fungo e viável economicamente. Optou-se assim pelo uso de sacos plásticos comuns, utilizados para armazenar alimentos.

Assim, depois de terem sido feitos estudos para verificar as condições ótimas de cultivo (luz, temperatura, substrato, teor inicial de água, condições de aeração, concentração inicial de inóculo e regime de agitação), foi montado um experimento em escala piloto para a produção do fungo *C. rosea* em sacos plásticos utilizando estas condições (Fig. 32).

FIGURA 32 – EXPERIMENTO EM ESCALA PILOTO PARA PRODUÇÃO DE ESPOROS DO FUNGO *C. rosea* EM SACOS PLÁSTICOS

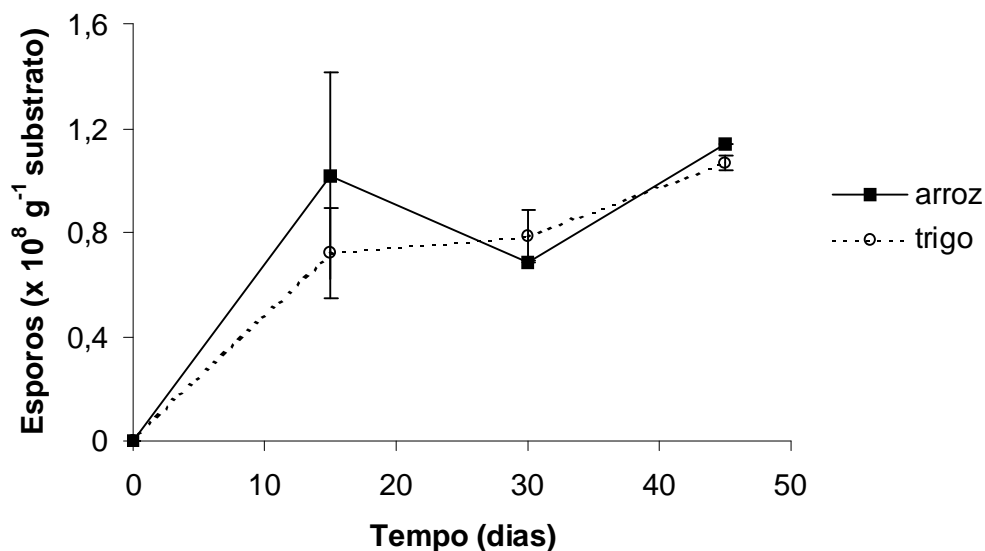


Inicialmente foram feitas avaliações qualitativas do sistema de sacos, o qual mostrou-se funcional e proporcionou um bom desenvolvimento do fungo associado a uma elevada produção de esporos ($1,14 \times 10^8$ esporos g^{-1} de substrato com arroz e $1,07 \times 10^8$ esporos g^{-1} de substrato) (Fig. 33). Do ponto de vista técnico, também apresentou um comportamento satisfatório: suportou o processo de autoclavagem; não houve

¹⁶ SILMAN, R.W.; NELSON, T.C.; BOTHAST, R.J. Comparison of culture methods for production of *Colletotrichum truncatum* spores for use as a mycoherbicide. **FEMS Microbiology Letters**, v.79, p.69-74, 1991. IBRAHIM, Y.B.; LOW, W. Potencial of mass-production and field efficacy of isolates of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* against *Plutella xylostella*. **International Journal of Pest Management**, v.39, p.288-292, 1993.

contaminação por bactérias e não houve acúmulo de água, indicando que os sacos plásticos permitiram uma troca de gases eficiente.

FIGURA 33 - PRODUÇÃO DE ESPOROS DO FUNGO *C. rosea* EM SACOS PLÁSTICOS



Esse sistema é uma alternativa economicamente viável para o pequeno produtor. Os principais materiais utilizados para a produção do fungo (sacos plásticos e substrato) apresentam um custo relativamente baixo. O processo de autoclavagem pode ser substituído por outros métodos mais simples de esterilização, como por exemplo o uso de panelas de pressão. Já as condições de assepsia necessárias para o preparo e para a inoculação dos sacos podem ser supridas pela realização destes procedimentos próximo a uma chama. As condições necessárias de luz e temperatura podem ser obtidas através da construção de um galpão onde a insolação possa ser controlada e a iluminação mantida constante (24 h de luz), ou ainda, através do uso de uma sala ou local disponível na propriedade que permita manter as condições adequadas. Por fim, esse sistema foi capaz de tolerar baixa aeração e agitação sem comprometer a produção de esporos, o que o torna um sistema ideal por requerer menor gasto de energia.

Portanto, o sistema de produção de *C. rosea* utilizando sacos é considerado uma alternativa factível e “escalonável” para ser adotada pelos produtores de morango.

5.7 ANÁLISE DOS PIGMENTOS

As diferentes colorações que *C. rosea* apresentou nas diversas condições de temperatura e luz em que foi incubado atraíram a atenção durante o decorrer dos experimentos. Como não existem relatos na literatura sobre o que seriam estes pigmentos nem sobre sua função, foi feito um experimento para elucidar a composição e a estrutura química do(s) pigmento(s) encontrados(s). Apenas SUTTON et al. (1997) relataram que colônias de *C. rosea* em meio ágar podiam apresentar coloração branca, alaranjada ou rosa salmão, no entanto, ele não especificou quais as condições que levam o fungo a apresentar essas mudanças.

Assim, três condições de cultivo foram escolhidas, 0 h de luz e 21 °C; 12 h luz e 20 °C e 24 h luz e 24 °C. Optou-se por realizar uma fermentação líquida visando a obtenção de um produto mais limpo. A partir da biomassa formada foi feita a extração dos pigmentos e, a seguir, a purificação das amostras. Dentre as amostras obtidas procedeu-se a identificação da amostra Cr12/0.

5.7.1 Análise Estrutural Fina do Pigmento por RMN de ^{13}C e ^{13}C -DEPT-135

A estrutura da amostra foi elucidada através dos experimentos de ^{13}C e DEPT-135 obtidos de estruturas nativas. No espectro de RMN de ^{13}C a amostra mostrou sinais de lipídeos na região de 39.9 a 22.6 ppm, característicos de grupos CH_2 . A presença de sinais em δ 172.9 e 173.4 indicou ligações do tipo éster (Fig. 33), sugerindo que a amostra poderia ser um possível glicerídeo.

O espectro de DEPT-135 da amostra (Fig. 34) mostrou sinais de CH_2 invertido entre δ 22.6 e 39.8, sendo que em δ 29.5 notou-se um sinal mais intenso relativo a CH_2 alifáticos. Sinais de CH_3 em δ 19.1 e 14.1, também foram evidenciados. O sinal de CH_3 em δ 19.1 e o sinal em 32.8 (possível CH) caracterizam a existência de um ácido

graxo ramificado. A presença de sinais de carbono acilado (CH-O) em δ 68.9 e presença de CH₂-O acilados em δ 62.1 em uma relação 1:2 (CH-OAcil/CH₂-OAcil) indicou a presença de uma molécula de glicerol esterificada por ácidos graxos. Os sinais entre δ 127.9 e 132.8 indicaram a presença de duplas ligações, sugerindo que os ácidos graxos apresentavam duplas ligações. Os experimentos de RMN de ¹³C e RMN de ¹³C DEPT sugeriram que a amostra tratava-se de um triacilglicerol, sendo que a unidade de glicerol apresentava-se esterificada por ácidos graxos insaturados em sua estrutura.

FIGURA 34 – ESPECTRO DE RMN DE ¹³C DA AMOSTRA Cr12/0

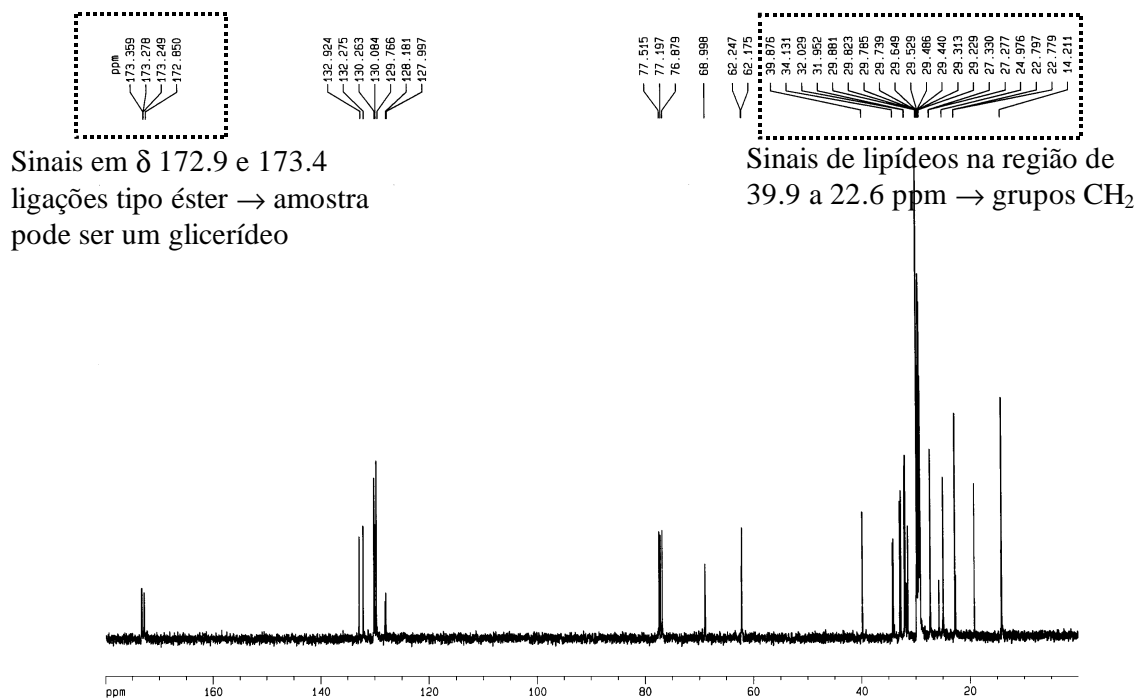
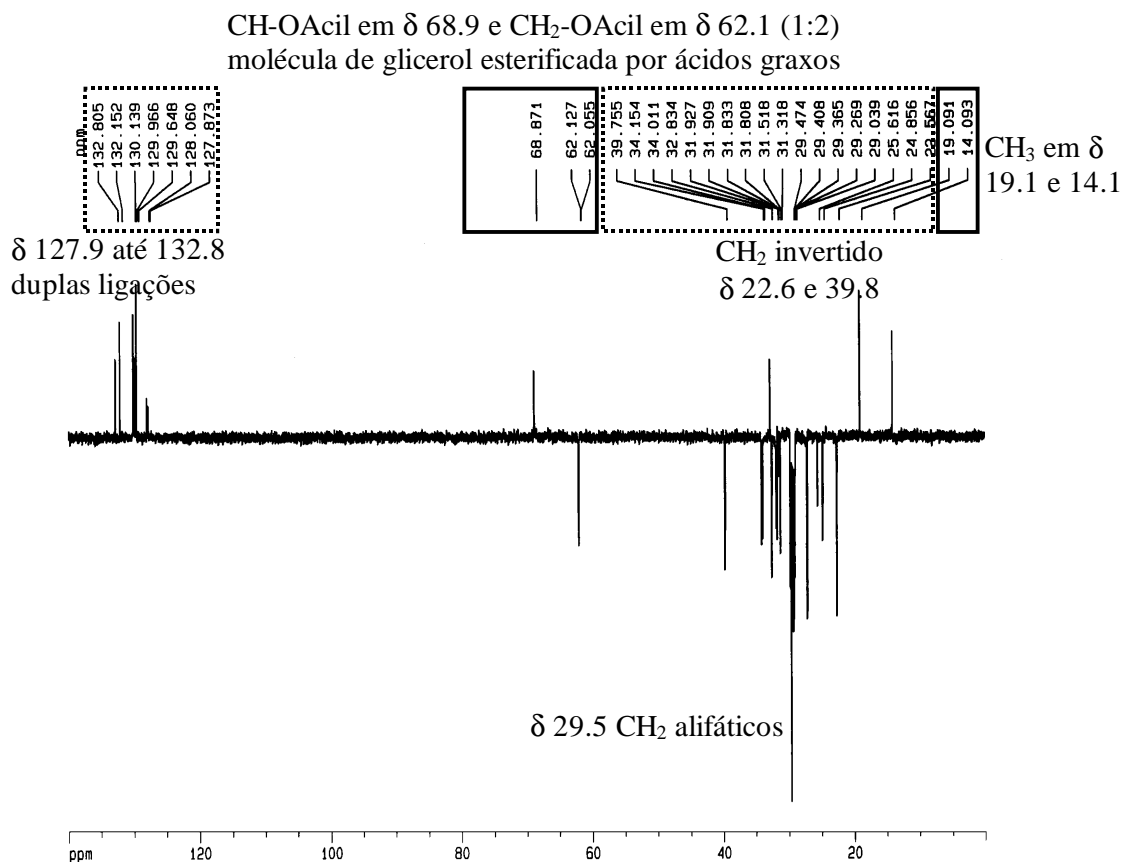


FIGURA 35 – ESPECTRO DE RMN 1D ^{13}C -DEPT DA AMOSTRA Cr12/0

5.7.2 Análise de AGME da Amostra Cr12/0 por CG-EM

A composição de ácidos graxos de Cr12/0 foi determinada por CG-EM através de seus AGME, obtidos após metanólise. O AGME mais abundante foi o $\text{C}_{18:1}^{\Delta 9}$ trans (ácido eláidico) que correspondeu a 44,16 % do total (Tab. 7), sendo que em quase todos os ácidos graxos que ocorrem naturalmente, as duplas ligações estão na configuração cis (NELSON; COX, 2000). A amostra mostrou também AGME de cadeia ímpar $\text{C}_{17:2}$ pouco comum.

TABELA 7 - COMPOSIÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS PRESENTES NO TRIACILGLICERÍDEO NEUTRO PURIFICADO

Ácidos graxos ^a	% de ácidos graxos no triacilglicerídeo
C _{16:0} (ác. palmítico)	11,78
C _{17:2} (ác. heptadecenóico)	0,78
C _{17:2} ^{Δ^{9, 12}} (ác. heptadecenóico)	7,18
C _{18:0} (ác. esteárico)	16,11
C _{18:1} ^{Δ⁹} trans (ác. eláidico)	44,16
C _{18:1} ^{Δ⁹} cis (ác. oléico)	0,36
C _{18:2} ^{Δ^{9, 12}} (ác. linoléico)	17,19
C _{18:3} ^{Δ^{9, 12, 15}} (ác. linolênico)	1,08
C _{20:0} (ác. araquídico)	0,99
C _{22:0} (ác. docosanóico)	0,37

^a AGME obtidos após metanólise e analisados por CG-EM (coluna DB-225)

Existe pouca informação em relação aos lipídios de *C. rosea* (mesmo considerando sua classificação anterior como *Gliocladium roseum*). A única informação disponível é que a quantidade total de lipídio no micélio seco corresponde a 22,4% do peso seco, mas não foi relatada a composição dos ácidos graxos (WEETE, 1974). Esse conteúdo de lipídios das hifas pode variar entre 1 e 50 % do peso seco dependendo da espécie, estágio de desenvolvimento e condições de cultivo.

De maneira geral, sabe-se que os principais ácidos graxos encontrados em fungos são o ácido palmítico (C_{16:0}), o ácido oléico (C_{18:1}^{Δ⁹}) e o ácido linoléico (C_{18:2}^{Δ^{9, 12}}), sendo que nesta amostra esses três ácidos correspondem a 33% do total. Os triacilglicerídeos são, freqüentemente, a classe de lipídios mais abundante extraída de fungos e ambos os isômeros saturados e insaturados são encontrados (GRIFFIN, 1994). Neste caso 29,25 % dos ácidos graxos são saturados e 70,75 % são insaturados.

A melhor caracterização deste e de outros pigmentos pode vir a auxiliar no entendimento da relação entre a luz e a alteração da cor do micélio, embora não existam relatos sobre lipídios pigmentados na literatura. Pode ainda aumentar a compreensão da função dos lipídios no ciclo biológico do fungo e na esporulação, pois nesta fase, para muitos fungos, ocorre um aumento na quantidade de lipídios produzida. Além disso, esses pigmentos podem ter algum potencial biotecnológico.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Notou-se, com a realização da revisão bibliográfica, que todos os estudos desenvolvidos com *C. rosea* visavam somente a realização de testes de campo para verificar a eficiência deste agente de biocontrole contra diversos patógenos, incluindo *Botrytis cinerea*, fungo causador do mofo cinzento no morango. Embora o fungo tenha sido relatado como um agente promissor por vários autores, não foi encontrado nenhum trabalho que focasse a otimização da produção dos esporos para aplicação.

A contribuição primária deste trabalho foi a padronização das condições para a produção de esporos e os protocolos para avaliá-la, sendo que as principais conclusões obtidas foram:

- o fungo apresentou variações na coloração e na morfologia quando incubado em diferentes condições de temperatura e fotoperíodo, sendo que o fotoperíodo foi a variável que mais influenciou a pigmentação;
- o fungo apresentou um crescimento micelial e esporulação mais rápidos na condição de 24 h luz e 24 °C;
- o melhor tempo de incubação das placas para preparar o inóculo, em termos de maior produtividade de esporos nesta etapa, foi de 8 dias;
- para assegurar a liberação máxima de esporos é aconselhável fazer agitação por 30 minutos da amostra em solução de água e Tween;
- para retirar uma amostra que represente com fidelidade os esporos produzidos, foi essencial misturar bem o substrato colonizado antes.

Outra contribuição foi a caracterização da cinética de produção de esporos pois nenhum trabalho nesta área foi encontrado. Conclui-se que a equação logística foi a que melhor descreveu os perfis de produção e, através da avaliação dos perfis obtidos com diferentes substratos, o arroz branco tipo agulhinha foi selecionado para o cultivo do fungo.

Uma terceira contribuição foi a otimização das condições de cultivo através da seleção de condições ideais, sendo que as mais promissoras, enquanto se mantendo práticas para pessoas com pouco treinamento, foram:

- teor inicial de água: 7,5 mL para cada 10 g de substrato;
- aeração: uso de tampão de algodão e gaze para fechar os erlenmeyers;
- concentração inicial de inóculo: 2×10^5 esporos g^{-1} substrato seco
- regime de agitação: agitação a cada 15 dias ou sem agitação;

Os rendimentos obtidos no arroz $3,36 \times 10^9$ esporos g^{-1} de substrato em 60 dias, no tratamento em que os erlenmeyers foram agitados a cada 15 dias, foi igual aos melhores relatados na literatura, mas com a diferença que (1) a amostragem foi feita em uma maneira mais fidedigna, sem tendências a superestimar a contagem e (2) o protocolo utilizado foi claro e pode ser facilmente reproduzido por outros pesquisadores.

Uma produção de esporos de *C. rosea* ainda maior talvez pudesse ser obtida caso fossem realizados experimentos como: testes com outros substratos, ou misturas deles e suplementação com outras fontes de nitrogênio para verificar se ocorreria estímulo da produção. Entretanto, o rendimento de esporos obtido neste trabalho é aceitável. Além disso, o rendimento não é o único critério para escolha do melhor protocolo, é necessário considerar a praticabilidade e a simplicidade do processo para que possa ser realizado por pessoas com pouco conhecimento sobre as técnicas de fermentação. Foi necessário estabelecer esse limite durante a realização dos experimentos para que essa transferência de tecnologia não se tornasse inviável, sendo que um teste de produção piloto em escala maior utilizando sacos plásticos foi realizado justamente para avaliar esse processo.

Mesmo não realizando mais experimentos visando otimizar a produção, outras áreas ainda precisam ser avaliadas antes que o produto seja liberado para utilização. Sugere-se que sejam feitas avaliações da “eficácia” dos esporos produzidos, visto que as condições de produção podem afetar a patogenicidade dos esporos. Também seria interessante realizar alguns testes com *C. rosea* visando comprovar que ele não causa nenhuma toxicidade às pessoas, principalmente no que se refere à ingestão. Esse tipo de resultado ajudará a romper quaisquer barreiras de rejeição que o produto possa receber pelos consumidores, os quais, por falta de conhecimento, muitas vezes preferem comer frutos com alto índice de resíduos de agroquímicos do que frutos

saudáveis que receberam somente tratamentos biológicos. Além disso, testes de toxicidade são exigidos pelo Governo para o registro e comercialização mesmo para produtos biológicos.

Outro ponto que merece destaque, embora não tenha sido estudado totalmente neste trabalho, é a produção e a identificação dos diferentes pigmentos de *C. rosea*. Estes pigmentos foram relatados mas nenhum estudo foi feito com o objetivo de caracterizá-los anteriormente ou de identificar quais condições ambientais poderiam estar relacionadas a essa variação de cor que foi encontrada. Como resultado preliminar dessa etapa, um dos pigmentos produzidos por *C. rosea*, na condição de 12 h de luz e 20 °C, foi caracterizado como um triacilglicerídeo composto por 10 diferentes ácidos graxos. Assim, é importante dar continuidade a este estudo, tentando elucidar a estrutura destes compostos, para, no futuro, pesquisar sua função no organismo e, quem sabe, encontrar alguma aplicação biotecnológica.

REFERÊNCIAS

BERRIE, A. Botrytis, Powdery Mildew and Blackspot of Strawberry. **Proceedings of National Soft Fruit Conference**. TEAGASC – The Irish Agriculture and Food Development Authority Horticultural Research International, East Malling, UK, March, 28th, 2000.

BOFF, P.; KRAKER, J.; GERLAGH, M.; KÖHL, J. The role of petals in development of grey mould in strawberries. **Fitopatologia Brasileira**, v.28(1), p.76-83, jan. 2003.

DALL'ONDER, G.M. **Produção e eficiência de conídios e biomassa de *Gliocladium roseum* no controle de *Botrytis cinerea* em morangueiro**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 115f., Porto Alegre, 1997.

DAROLT, M.R. **Agricultura Orgânica: inventando o futuro**. IAPAR, 250p., Londrina, 2002.

DOELLE, H.W.; MITCHELL, D.A.; ROLZ, C.E. **Solid substrate cultivation**. Elsevier Applied Biotechnology Series, 1992.

ELLAIAH, P.; SRINIVASULU, B.; ADINARAYANA, K. Optimisation studies on neomycin production by a mutant strain of *Streptomyces marinensis* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v.39, p.529-534, 2004.

FISHER, P. **Identification of Diseases on Strawberry Fruit**. OMAF, 2002. Disponível em <www.gov.on.ca/OMAFRA/english/crops/facts/straw_diseases.htm> Acesso em: 14 ago. 2003.

FOKKEMA, N.J. Opportunities and problems of control of foliar pathogens with micro-organisms. **Pesticide Science**, v.37(4), p.411-416, 1993.

GRIFFIN, D.H. **Fungal Physiology**. Second Edition, Wiley-Liss, 458 p., 1994.

HERRERA, J. **Herrera's microfungi home page**. Division of Science, Truman State University, Kirksville, MO, 2000. Disponível em <<http://microfungi.truman.edu/>> Acesso em 10 jun. 2003.

IKASARI, L.; MITCHELL, D.A. Two-phase model of the kinetics of growth of *Rhizopus oligosporus* in membrane culture. **Biotechnology and Bioengineering**, v.68, p.619-627, 2000.

JAMES, R.L.; DUMROESE, R.K.; WENNY, D.L. **Principles and potencial for biocontrol of diseases in forest and conservation nurseries**. In: Landis, T.D., technical coordinator. Proceedings, Western Forest Nursery Association, Fallen Leaf Lake, CA, September 14-18 1992. Disponível em <<http://www.fcnanet.org/proceedings/1992/james.pdf>> Acesso em 10 jun. 2003.

JENKINS, N.E.; HEVIEFO, G.; LANGEWALD, J.; CHERRY, A.J.; LOMER, C.J. Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. **Biocontrol News and Information**, v.19(1), p.21N-31N, 1998.

JENSEN, B.; KNUDSEN, I.M.B.; JENSEN, D.F. Survival of conidia of *Clonostachys rosea* on stored barley seeds and their biocontrol efficacy against seed-borne *Bipolaris sorokiniana*. **Biocontrol Science and Technology**, v.12(4), p.427-441, Aug. 2002.

KÖHL, J.; MOLHOEK, W.M.L.; van der PLAS, C.H.; FOKKEMA, N.J. Suppression of sporulation of *Botrytis* spp. as a valid biocontrol strategy. **European Journal of Plant Pathology**, v.101, p.251-259, 1995.

KOVACH, J.; PETZOLDT, R.; HARMAN, G.E. Use of honey bees and bumble bees to disseminate *Trichoderma harzianum* 1295-22 to strawberries for *Botrytis* control. **Biological Control**, v.18, p.235-242, 2000.

KRAUSS, U.; SOBERANIS, W. Effect of fertilization and biocontrol application frequency on cocoa pod diseases. **Biological Control**, v.24, p.82-89, 2002.

LEGARD, D.E.; MERTELY, J.C. Botrytis fruit rot (gray mold) and flower blight of strawberry. **PP-172 Plant Pathology Department**, Gulf Coast Research and Education Center – Dover, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, 2000. Disponível em: <<http://edis.ifas.ufl.edu>> Acesso em: 13 ago. 2003.

LI, G.Q.; HUANG, H.C.; KOKKO, E.G.; ACHARYA, S.N. Ultrastructural study of mycoparasitism of *Gliocladium roseum* on *Botrytis cinerea*. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v.43, p.211-218, 2002.

MALLOCH, D. **Moulds Isolation, cultivation, identification**. Department of Botany, University of Toronto, 1997. Disponível em

<<http://www.botany.utoronto.ca/ResearchLabs/MallochLab/Malloch/Moulds/Moulds.html>> Acesso em 6 jun. 2003.

MANNING, M.; ALBERT, M.; PERCY, H. **HortFACT - Dry eye rot (*Botrytis cinerea*) in apples and pears**. The Horticulture and Food Research Institute of New Zealand Ltd, 1997. Disponível em <<http://www.hortnet.co.nz/publications/hortfacts/hf205012.htm>> Acesso em 6 jun. 2003.

MILJØPROJEKT. **Development of a biological control agent for seed treatment / Udvikling af et biologisk bejdsemiddel til frø**. N.º 463, 1999. Disponível em: <http://www.mst.dk/udgiv/publikationer/1999/87-7909-244-6/html/samfat_eng.htm> Acesso em: 10 jun. 2003.

MORANDI, M.A.B.; MAFFIA, L.A.; MIZUBUTI, E.S.G.; ALFENAS, A.C.; BARBOSA, J.G. Supression of *Botrytis cinerea* sporulation by *Clonostachys rosea* on rose debris: a valuable component in Botrytis blight management in commercial greenhouses. **Biological Control**, v.26, p.311-317, 2003.

MORANDI, M.A.B.; SUTTON, J.C.; MAFFIA, L.A. Relationships of aphid and mite infestations to control of *Botrytis cinerea* by *Clonostachys rosea* in rose (*Rosa hybrida*) leaves. **Phytoparasitica**, v.28(1), p.1-10, 2000.

MORDOCCO, A. **Fermentation Studies of Conidia Production by *Metarhizium anisopliae***. Thesis (Doctor of Philosophy) – The University of Queensland, Austrália, 2000.

MORIN, L. Mass-production of fungi for bioherbicides. **Plant Protection Quartely**, v.7(4), p.143-148, 1992.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 3ª Ed. Worth Publishers, New York, 2000.

NIELSEN, L.K.; SMYTH, G.K.; GREENFIELD, P.F. Hemacytometer cell count distributions: implications of non-Poisson behavior. **Biotechnology Progress**, v.7 (6), p.560-563, 1991.

ONOFRE, S.B.; MINIUK, C.M.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. Growth and sporulation of *Metarhizium flavoviride* var. *Flavoviride* on culture media and lighting regimes. **Scientia Agricola**, v.58, n.3, p.613-616, 2001.

PENG, G.; SUTTON, J.C.; KEVAN, P.G. Effectiveness of honey bees for applying the biocontrol agent *Gliocladium roseum* to strawberry flowers to suppress *Botrytis cinerea*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.14(2), p.114-129, 1992.

PENG, G.; WALKER, G.; SUTTON, G.C. **Gray Mold Fruit Rot Of Strawberry**. Agriculture and Rural, Queen's Printer for Ontario, 2003. Disponível em <www.gov.on.ca/OMAFRA/english/crops/facts/92-103.htm> Acesso em: 14 ago. 2003.

PRITTS, M. **The Berry Diagnostic Tool - a companion to the NRAES Production Guides for Strawberries, Raspberries and Blueberries**. Cornell University, Ithaca, NY. Disponível em <<http://www.hort.cornell.edu/departament/faculty/pritts/BerryDoc/strawberry/flowersandfruit/Graymold3.htm>> Acesso em: 5 ago. 2003.

PUNJA, Z.K.; UTKHEDE, R.S. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. **Trends in Biotechnology**, v.21(9), p.400-407, Sept. 2003.

RONQUE, E.R.V. **A Cultura do Morangueiro**. EMATER-PR, 206p., Curitiba, 1998.

SALIGKARIAS, I.D.; GRAVANIS, F.T.; EPTON, H.A.S. Biological control of *Botrytis cinerea* on tomato plants by the use of epiphytic yeasts *Candida guilliermondii* strains 101 and US 7 and *Candida oleophila* strain I-182: I. in vivo studies. **Biological Control**, v.25, p.143-150, 2002.

SÁNCHEZ-MURILLO, R.I.; TORRE-MARTÍNEZ, M.; AGUIRRE-LINARES, J.; HERRERA-ESTRELLA, A. Light-regulated asexual reproduction in *Paecilomyces fumosoroseus*. **Microbiology**, 150, p.311-319, 2004.

SANGSURASAK, P; NOPHARATANA, M.; MITCHELL, D.A. Mathematical modeling of the growth of filamentous fungi in solid-state fermentation. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v.55, p.333-342, 1996.

SCHROERS, H.J.; SAMUELS, G.J.; SEIFERT, K.A.; GAMS, W. Classification of the mycoparasite *Gliocladium roseum* in *Clonostachys* as *G. rosea*, its relationship to *Bionectria ochroleuca*, and notes on other *Gliocladium*-like fungi. **Mycologia**, 91, p.365-385, 1999.

SHAFIA, A.; SUTTON, J.C.; YU, H.; FLETCHER, R.A. Influence of preinoculation light intensity on development and interactions of *Botrytis cinerea* and *Clonostachys rosea* in tomato leaves. **Canadian Journal Of Plant Pathology**, v.23(4), p.346-357, Dec. 2001.

SILVA, I. C. **Manejo Ecológico de pragas: resíduos, controle biológico e natural**. Disponível em: <<http://www.esam.br/gvaa/publicacao/gr11-05-01.pdf>> Acesso em: 10 jun. 2003.

SURGEONER, G. **Pest Management Research – Plant Program**. University of Guelph – Presented to the Agricultural Research of Ontario, 162p., Oct. 1998.

SUTTON, J.C. **Biological control of Botrytis Grey Mold (*Botrytis cinerea*) in greenhouse ornamentals and vegetables**. Dept. of Environmental Biology, UofG, OMAFRA Education and Research, 2002.

SUTTON, J.C.; LIU, W.; HUANG, R.; OWEN-GOING, N. Ability of *Clonostachys rosea* to establish and suppress sporulation potential of *Botrytis cinerea* in deleafed stems of hydroponic greenhouse tomatoes. **Biocontrol Science and Technology**, v.12(4), p.413-425, Aug. 2002.

SUTTON, J.C.; LI, DE-WEI; PENG, G.; YU, H.; ZHANG, P.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M. *Gliocladium roseum*: a versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. **Plant Disease**, Ontário, v.81, p.316-328, 1997.

SUTTON, J.C.; YU, H. **Inoculum production of *Gliocladium roseum***. Ontário: Departament of Environmental Biology. University of Guelph, 1p., 1994.

TATAGIBA, J.S.; MAFFIA, L.A.; BARRETO, R.W.; ALFENAS, A.C.; SUTTON, J.C. Biological control of *Botrytis cinerea* in residues and flowers of rose (*Rosa hybrida*). **Phytoparasitica**, v.26:1, 1998.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M.; SUTTON, J.C.; PERAZZOLO, I.; CZERMAINSKI, A.B.C. Controle biológico de *Botrytis cinerea* em morangueiros cultivados em estufa. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22 (1), p.69-73, mar. 1997.

VICINI, G.; MITCHELL, D.A.; D'BOIT, S.; GERN, J.C.; ROSA, A.S.; COSTA, R.M.; DALSENTER, F.D.H.; von MEIEN O.F.; KRIEGER, N. Analysis of growth kinetic profiles in solid-state fermentation. **Food Technology and Biotechnology**, v.39(4), p.271-294, 2001.

VIGLIO, E.C.B.L. Produtos orgânicos: uma tendência para o futuro? **Agroanalysis**, dez. 1996.

WEETE, J.D. **Fungal lipid biochemistry – distribution and metabolism**. (Monographs in lipid research. V.1) Plenum Press, New York and London, 393 p., 1974.

WIDJAYANTI, R.D.E. **Solid state fermentation and metabolic study of *Monascus* pigment production**. Thesis (Doctor of Philosophy) – The University of Queensland, Austrália, 1997.

YU, H.; SUTTON, J.C. Effectiveness of Bumblebees and Honeybees for delivering inoculum of *Gliocladium roseum* to raspberry flowers to control *Botrytis cinerea*. **Biological Control**, v.10, p.113-122, 1997.

APÊNDICE 1 - CÂMARA DE NEUBAUER

CÂMARA DE NEUBAUER

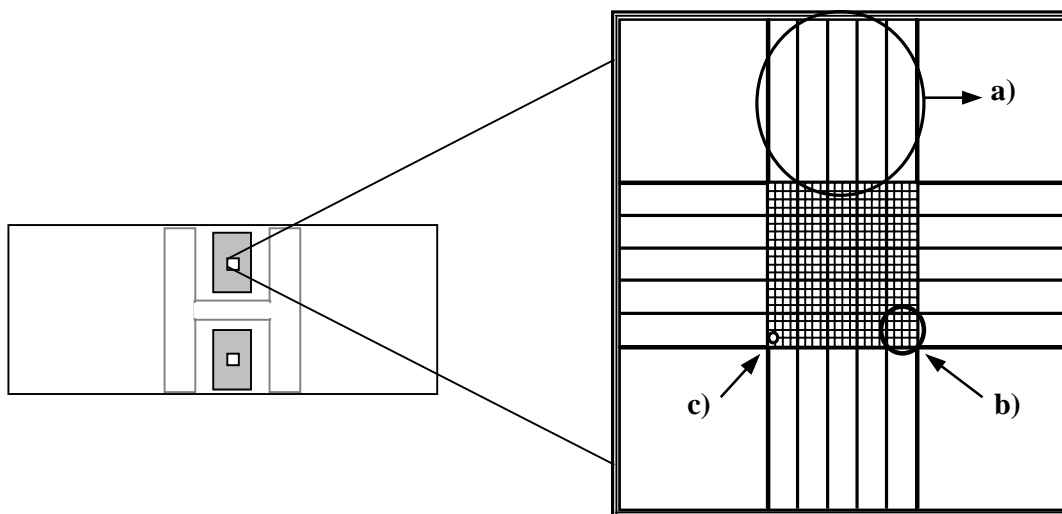
A contagem de células através de uma Câmara de Neubauer ou hemacitômetro é uma técnica padrão usada em muitos laboratórios. Estimativas acuradas do número de células são essenciais para o desenvolvimento e a validação de modelos quantitativos de crescimento celular e expressão de produtos. Os dois parâmetros principais que determinam a margem de erro da contagem usando uma Câmara de Neubauer são: (1) número de Câmaras contadas (isto é, o número de vezes que a Câmara é totalmente preenchida e contada) e (2) número de células ou, no caso deste estudo, esporos contados em cada Câmara inteira.

Assim, esta seção tem o objetivo de relatar os procedimentos utilizados para a contagem de esporos em Câmara de Neubauer pois este foi o principal método de avaliação dos experimentos realizados nesta dissertação.

PROTOCOLO PARA CONTAGEM DE ESPOROS EM CÂMARA DE NEUBAUER

A Câmara de Neubauer é um instrumento utilizado para estimar o número de células em um volume determinado com auxílio de um microscópio. É composta por uma lâmina de vidro fina com duas áreas de contagem (uma de cada lado da Câmara), sendo que cada uma possui 0,1 mm de profundidade (Fig. 35). Além disso, cada câmara é dividida em 9 quadrados grandes (Fig. 35 – a), delimitados por 3 linhas brancas. O quadrado grande central é subdividido em 25 quadrados médios (Fig. 35 – b). Estes 25 quadrados são novamente subdivididos em 16 quadrados menores (Fig. 35 – c). Esta superfície marcada tem uma área de 9 mm^2 . Uma lamínula deve ser utilizada para cobrir as duas câmaras de contagem.

FIGURA 36 - CÂMARA DE NEUBAUER



Existem diferentes maneiras de realizar a contagem numa Câmara de Neubauer:

- contagem de 5 quadrados médios (os 4 quadrados dos cantos e o quadrado central);
- contagem total de um dos lados (de uma das câmaras de contagem – que corresponde ao quadrado grande central);
- contagem total dos dois lados (Câmara inteira – que corresponde ao quadrado grande central de cada lado).

No entanto, estes métodos fornecem diferentes graus de precisão. Assim, antes de iniciar as avaliações dos experimentos foi necessário determinar quantos esporos e lados têm que ser contados para obter um nível de confiabilidade razoável.

Foram feitos testes preliminares de contagem de esporos onde foi constatado que os esporos apresentavam uma distribuição irregular. Esse comportamento fez com que fossem descartados os métodos onde somente alguns quadrados médios são contados. Além disso, NIELSEN; SMYTH; GREENFIELD, (1991) relataram que existe uma grande correlação entre os dois lados da Câmara e montaram um protocolo que estabelece qual a margem de erro que pode ser obtida de acordo com o número de Câmaras que forem contadas (contagem dos dois lados) (Tab. 8).

TABELA 8 - PROTOCOLO PARA OBTENÇÃO DE MARGENS DE ERRO DE 10%, 15% E 20%

Margem de erro	n.º de Câmaras totais	Total de esporos contados
10%	7	1273
15%	3	615
20%	2	250

FONTE: NIELSEN; SMYTH; GREENFIELD, (1991)

Optou-se por realizar a contagem dos dois lados da Câmara (câmara inteira). A maioria dos experimentos foi feita em triplicata, sendo que de cada um dos erlenmeyers foi retirada uma amostra de 1 g de substrato colonizado. Após a extração dos esporos foram feitas as diluições necessárias para realizar a contagem em câmara de Neubauer. Para cada amostra de esporos foram feitas 3 contagens, nos dois lados da câmara, contando todos os quadrados menores e médios. Assim, cada ponto no gráfico é uma média de 9 contagens (3 amostras x 3 contagens na câmara de Neubauer para cada uma). De acordo com o protocolo de NIELSEN; SMYTH; GREENFIELD, (1991) obteve-se uma margem de erro de 15%, isto corresponde a uma variação de 15% ao redor da média obtida para cada amostra.

MÉTODO PARA UTILIZAÇÃO DA CÂMARA DE NEUBAUER

Esta seção apresenta, de forma simplificada, o protocolo para utilização da Câmara de Neubauer na contagem de esporos. Inicialmente a lamínula e a Câmara foram limpadas com álcool (70%), a seguir, as extremidades da Câmara próximas aos canais laterais foram umedecidas com água. A lamínula foi colocada sobre os canais e as áreas de contagem. Isso foi feito para garantir que a profundidade na Câmara fosse de 0,1 mm em toda a extensão.

Na sequência, uma alíquota de 10 µL foi extraída de uma suspensão de esporos e transferida para a Câmara. Para isso a ponta da pipeta foi colocada no canal

em um dos lados e o fluido foi forçado a sair, permitindo assim que entrasse na Câmara por capilaridade. Esse procedimento foi repetido para o outro lado da Câmara.

A seguir a Câmara foi colocada sob o microscópio (objetiva de 40x) onde realizou-se a contagem dos esporos com auxílio de um contador manual. Foram contados todos os esporos que estavam dentro da área do quadrado grande central, incluindo aqueles que estavam sobre as linhas superior e direita do perímetro externo do quadrado médio. Os esporos que estavam sobre as linhas inferior e esquerda deste quadrado não foram incluídos na contagem.

Após a contagem a lamínula foi retirada e juntamente com a Câmara, elas foram limpas com álcool. Assim, o protocolo foi repetido novamente por mais 2 vezes, visto que para avaliar cada amostra foram retiradas e contadas três alíquotas (subamostras).

CÁLCULO DO NÚMERO DE ESPOROS POR GRAMA DE SUBSTRATO

Após realizar as contagens, fez-se a soma do número de esporos obtido para cada Câmara e a média dos resultados obtidos para as 3 subamostras. A partir desta quantidade média de esporos, foram feitos os cálculos necessários para obter o número total de esporos por grama de substrato.

Inicialmente foi calculada a quantidade de esporos por mL de amostra. Para isso, a média de esporos obtida a partir das 3 contagens realizadas é dividida por 2 para representar um dos lados da Câmara e multiplicada pelo fator 10.000. Esse fator corresponde a transformação do volume de 0,1 µL por lado da Câmara para dar uma resposta por mL:

$$\text{esporos} \cdot \text{mL}^{-1} = (\text{média esporos}/2) \times \text{diluição} \times 10.000 \quad (5)$$

A seguir foi feito o cálculo da quantidade de esporos por g de substrato. Para isso, a quantidade de esporos por mL obtida anteriormente foi multiplicada por 50 mL, que corresponde a quantidade de solução de água e Tween utilizada para a agitação da

amostra para liberação dos esporos, fornecendo assim a quantidade total de esporos extraída. Essa quantidade foi dividida pelo peso úmido da amostra (em g). Assim, obteve-se a quantidade de esporos por g de substrato:

$$esporos \cdot g^{-1} \text{ substrato} = (esporos \text{ mL}^{-1} / g \text{ amostra}) \times 50 \text{ mL} \quad (6)$$

Um exemplo dos cálculos feitos para avaliação dos experimentos de produção de esporos é apresentado a seguir.

Partindo da contagem de esporos de um erlenmeyer (Tab. 9) com as seguintes características: arroz branco – 7,5 mL de água; amostra (g) = 1,0037 e diluição de 100 x, foram feitos os cálculos necessários para obter a quantidade de esporos por g de substrato neste frasco.

TABELA 9 - EXEMPLO DE CONTAGEM DE ESPOROS

	Câmara 1	Câmara 2	Câmara 3
Esporos	21	28	19
	26	16	26
Total de esporos	47	44	45

1) média de esporos obtidos:

$$esporos = \frac{47 + 44 + 45}{3} = 45,33$$

2) quantidade de esporos por mL de amostra

$$esporos \cdot \text{mL}^{-1} = (45,33/2) \times 100 \times 10000 = 22666667$$

3) quantidade de esporos por g de substrato

$$esporos \cdot g^{-1} \text{ substrato} = (22666667/1,0037) \times 50 \text{ mL} = 1,13 \times 10^9$$

Dessa forma foram obtidas as quantidades de esporos de cada grama de amostra retirada de cada erlenmeyer em cada tratamento.

APÊNDICE 2 – DADOS PARA AS FIGURAS

DADOS PARA AS FIGURAS

Para Figura 11. CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE *C. rosea* EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE TEMPERATURA E FOTOPERÍODO

a)	Área (cm ²)					
Tempo (dias)	24 h luz 24 °C	24 h luz 24 °C / 0 h luz 20°C	12 h luz 20 °C	12 h luz T ambiente	0 h luz 21 °C	0 h luz 31 °C
0	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37
2	0,83	1,08	0,61	0,58	0,54	0,89
4	3,37	3,12	2,09	2,12	2,11	3,48
6	8,47	5,90	5,12	5,84	5,01	8,90
8	14,59	8,99	9,41	11,25	8,82	15,10
10	21,89	18,22	14,31	18,31	13,63	22,39
12	29,53	29,07	18,98	26,09	20,09	26,33
14	37,48	34,95	25,10	35,45	27,98	31,47
16	42,89	39,99	31,45	44,11	36,33	33,58
18	47,49	48,66	38,34	51,10	44,66	34,51
20	52,01	52,72	45,01	55,96	51,07	50,18
22			50,01			
24			52,89			
26			53,01			

b)	Área (cm ²)		
Tempo (dias)	24 h luz 31 °C	0 h luz 10 °C	0 h luz 35 °C
0	0,37	0,37	0,37
2	1,41	0,39	0,61
4	4,13	0,51	1,09
6	8,15	0,51	1,67
8	12,61	0,65	3,43
10	16,20	0,82	4,80
12	19,67	1,03	6,48
14	21,43	1,13	8,51
16	22,86	1,31	9,75
18	23,80	1,61	11,81
20	24,07	1,91	14,11
22	24,34	2,13	16,67
24		2,41	18,19
26		2,79	20,55
28		3,08	23,73
30		3,38	26,87
32		4,07	29,96

34	4,61	31,69
36	5,68	34,53
38	6,85	39,69
40	7,99	40,98
42	10,04	43,34
44	13,34	43,69
46	16,98	43,42
49	24,53	44,76
52	31,51	42,69
56	43,07	44,08
60	51,72	43,78

Para Figura 12. CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE ESPOROS EM PLACAS DE PETRI

Tempo (dias)	Esporos ($\times 10^9$) placa ⁻¹
1	0,018306
2	0,11081
3	0,575282
4	1,203772
5	1,925742
6	3,775822
7	4,432381
8	6,306867
9	6,375208
10	6,18239
11	6,782811
12	6,489923
13	7,058615

Para Figura 13. CINÉTICA DE LIBERAÇÃO DE ESPOROS UTILIZANDO ARROZ COMO SUBSTRATO

Tempo (min)	Esporos ($\times 10^7$) mL ⁻¹
0	0,048667
5	0,776667
10	1,265
15	1,318333
20	1,451667
25	1,488333
30	1,501667
40	1,513333
50	1,473333
60	1,493333

Para Figura 14. INFLUÊNCIA DE DIFERENTES LOCAIS DE RETIRADA DE AMOSTRA NA PRODUÇÃO DE ESPOROS SOBRE ARROZ

Tempo (dias)	Esporos ($\times 10^7$) g ⁻¹ arroz		
	parte superior	após a mistura	parte inferior
0	0,033167496		
1	0,215709839		
2	0,361654933		
10	4,078505043	2,289156627	1,720491208
11	5,711091669	3,428474511	1,480341071
12	5,541891338	3,062717133	2,004624164

Para Figura 15. PERFIL DE PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *C. rosea* SOBRE TRIGO, MOSTRANDO O AJUSTE DA EQUAÇÃO LOGÍSTICA E DO MODELO DE DESACELERAÇÃO AOS DADOS*

Tempo (dias)	Esporos ($\times 10^9$) g ⁻¹ substrato
0	0,0053
0	0,0058
0	0,0046
5	0,0302
5	0,0356
5	0,0182
10	0,0634
10	0,0850
10	0,0583
15	0,0919
15	0,0768
15	0,0895
20	0,1122
20	0,0952
20	0,0944
25	0,0985
25	0,1240
25	0,1222
30	0,1280
30	0,1134
30	0,1354
35	0,1289
35	0,1165
35	0,1169
40	0,1348
40	0,1787
40	0,1264

* dados em triplicata

Para Figura 16. PERFIL DE PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *C. rosea* SOBRE TRIGO, COM AJUSTE DA EQUAÇÃO LOGÍSTICA – DADOS DE DALL’ONDER (1997)

Tempo (dias)	Esporos ($\times 10^8$) g ⁻¹ substrato
0	0,07
4	0,4
16	18,7
22	37,5
30	43

Para Figura 17. PRODUÇÃO DE ESPOROS UTILIZANDO DIFERENTES FORMAS DE PREPARAÇÃO DO SUBSTRATO – GRÃOS DE TRIGO

Tempo (dias)	Esporos ($\times 10^8$) g ⁻¹ substrato		
	C/ precocimento	S/ precocimento	C/ precoz + 15 mL água
0	0,00649	0,052328901	0,018837491
5	0,160124	0,279870835	
10		0,689234748	0,051066524
15	1,811773	0,860973809	
20		1,006046884	
25	1,986184	1,149036303	0,157158862
30		1,255888314	
35	2,150166	1,207848454	
40		1,466426327	

Para Figura 18. PRODUÇÃO DE ESPOROS UTILIZANDO ARROZ E TRIGO COMO SUBSTRATO

Tempo (dias)	Esporos ($\times 10^9$) g ⁻¹ de substrato	
	Arroz branco	Trigo
0	0,003786571	0,00523289
5	0,36298077	0,027987084
10	0,467710181	0,068923475
15	0,498100621	0,086097381
20	0,570519143	0,100604688
25	0,675835928	0,11490363
30	0,865461312	0,125588831
35	1,029114634	0,120784845
40	1,053946959	0,146642633

Para Figura 19. PERFIL DE PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *C. rosea* SOBRE TRIGO E ARROZ BRANCO, COM AJUSTE DA EQUAÇÃO LOGÍSTICA AOS DADOS

Foram utilizados os mesmos dados da Figura 18.

Para Figura 20. PRODUÇÃO DE ESPOROS UTILIZANDO DOIS TIPOS DISTINTOS DE ARROZ COMO SUBSTRATO

Tempo (dias)	Esporos ($\times 10^9$) g ⁻¹ substrato	
	Arroz branco	Arroz integral
0	0,003787	0,008471
5	0,362981	
10	0,46771	0,184489
15	0,498101	0,379764
20	0,570519	
25	0,675836	0,469239
30	0,865461	0,675095
35	1,029115	
40	1,053947	0,682652

Para Figura 21. PERFIL DE PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *C. rosea* SOBRE ARROZ BRANCO E ARROZ INTEGRAL, COM AJUSTE DA EQUAÇÃO LOGÍSTICA AOS DADOS

Foram utilizados os mesmos dados da Figura 20.

Para Figura 22. PRODUÇÃO DE ESPOROS EM DIFERENTES TEORES INICIAIS DE ÁGUA

Tempo (dias)	Esporos ($\times 10^8$) g ⁻¹ substrato			
	15 mL de água	10 mL de água	7,5 mL de água	5 mL de água
0	0,056644	0,003787	0,037866	0,037866
10	0,432303			
15		2,4039	5,787321	2,499224
25	0,463116			
30		3,488836	8,66733	3,292787
45		3,422589	9,02244	2,395535
60		2,899521	13,26028	3,792371

Para Figura 24. VARIAÇÃO DA FRAÇÃO DE ÁGUA EM TRATAMENTOS COM DIFERENTES TEORES INICIAIS DE ÁGUA

Tempo (dias)	Fração de água (g água g^{-1} amostra)			
	15 mL de água	10 mL de água	7,5 mL de água	5 mL de água
0	0,635954	0,524585	0,458318	0,367526
5		0,498385		
10	0,612749	0,470458		
15		0,374759	0,288501	0,09661
20		0,295329		
25	0,375736	0,199744		
30		0,084821	0,083508	0,080579
35		0,056106		
40		0,051793		
45			0,080211	0,082306
60			0,085869	0,086995

Para Figura 25. PRODUÇÃO DE ESPOROS (A) E VARIAÇÃO DA FRAÇÃO DE ÁGUA (B) EM TRÊS CONDIÇÕES DE AERAÇÃO DIFERENTES

a)		Esporos ($\times 10^8$) g^{-1} substrato	
Tempo (dias)	Tampão de algodão	Papel higiênico desde dia 0	Papel higiênico desde dia 15
0	0,003786571	0,003786571	0,003786571
15	2,403900015	6,617963754	2,785898563
30	3,488836052	6,638469258	4,971473357
45	3,422588867	7,788911095	4,457154802
60	2,899520801	7,820974215	4,498354073

b)		Fração de água (g água g^{-1} amostra)	
Tempo (dias)	Tampão de algodão	Papel higiênico desde dia 0	Papel higiênico desde dia 15
0	0,519581	0,519581	0,519581
15	0,513547	0,077795	0,480802
30	0,147391	0,078481	0,069509
45	0,067935	0,078532	0,071801
60	0,077561	0,093396	0,07864

Para Figura 26. PRODUÇÃO DE ESPOROS UTILIZANDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE INÓCULO

Tempo (dias)	Esporos ($\times 10^9$) g^{-1} substrato				
	C1	C2	C3	C4	C5
0	0,000378657	0,000378657	0,000378657	0,000378657	0,000378657
15	1,023255225	1,174019967	1,122424082	1,429595094	1,379100571
30	1,327498763	2,013403521	1,592045832	1,83195704	2,221918752
45	1,936263356	2,046214388	2,530302153	2,306792862	2,159782826
60	1,987730548	2,222748671	2,838712655	2,979078348	2,883456168

Para Figura 27. COMPARAÇÃO ENTRE A PRODUÇÃO MÁXIMA DE ESPOROS OBTIDA E AS CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE INÓCULO UTILIZADAS

Esporos ($\times 10^9$) g^{-1} substrato	log10 concentração do inóculo (Esporos g^{-1} substrato seco)
1,987730548	6,77815125
2,222748671	6,380211242
2,838712655	6
2,979078348	4,954242509
2,883456168	3,954242509

Para Figura 28. VARIAÇÃO DA FRAÇÃO DE ÁGUA EM TRATAMENTOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE INÓCULO

Tempo (dias)	Fração de água (g água g^{-1} amostra)				
	C1	C2	C3	C4	C5
0	0,51958	0,51958	0,51958	0,51958	0,51958
15	0,46023	0,46388	0,48679	0,4385	0,43543
30	0,22605	0,15303	0,12194	0,17674	0,17529
45	0,07639	0,07444	0,07938	0,07629	0,07949
60	0,07562	0,07364	0,07385	0,07267	0,06914

Para Figura 29. PRODUÇÃO DE ESPOROS EM DIFERENTES REGIMES DE AGITAÇÃO

Tempo (dias)	Esporos ($\times 10^9$) g^{-1} substrato				
	ND	TD	3D	7D	15D
0	0,000378657	0,000378657	0,000378657	0,000378657	0,000378657
15	2,049414407	0,409245077	0,56827245	1,661164861	2,301138158
30	2,757391063	0,697368876	1,918979806	2,838049267	3,224048213
45	2,187518875	1,169687519	0,882543985	2,898910101	2,769881451
60	2,649396704	1,248845361	1,757870506	2,596229926	3,354606685

Para Figura 30. COMPARAÇÃO ENTRE A PRODUÇÃO MÁXIMA DE ESPOROS OBTIDA E OS DIFERENTES REGIMES DE AGITAÇÃO

Esporos ($\times 10^9$) g ⁻¹ substrato	Frequência de agitação (n.º vezes durante 60 dias)
1,248845361	60
1,757870506	20
2,596229926	8,57143
3,354606685	4
2,649396704	0

Para Figura 33. PRODUÇÃO DE ESPOROS DO FUNGO *C. rosea* EM SACOS PLÁSTICOS

Tempo (dias)	Esporos ($\times 10^8$) g ⁻¹ substrato	
	Arroz branco	Trigo
0	0	0
15	1,016165631	0,720916366
30	0,686428863	0,785220564
45	1,135585838	1,066109297